

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

MARIA IZABEL GOULARTE MORITZ

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DE ORGANISMOS MARINHOS DO SUL DO  
BRASIL E DA ARGENTINA

Florianópolis  
2014



Maria Izabel Goularte Moritz

**Investigação química de organismos marinhos do sul do Brasil e da  
Argentina**

Tese submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Doutor em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Eloir Paulo  
Schenkel

Coorientador: Prof. Dr. Jorge  
Alejandro Palermo

Florianópolis  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Moritz, Maria Izabel Goularte

Investigação química de organismos marinhos do sul do Brasil e da Argentina. / Maria Izabel Goularte Moritz ; orientador, Eloir Paulo Schenkel ; coorientador, Jorge Alejandro Palermo. - Florianópolis, SC, 2014.  
141 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Leptogorgia punicea. 3. Octocorais. 4. Esteroides polioxigenados. 5. Química de produtos naturais. I. Schenkel, Eloir Paulo. II. Palermo, Jorge Alejandro. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.





## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-graduação em Farmácia e ao CNPq e à Capes pelo suporte financeiro e espaço físico para a realização desse trabalho.

À UMYMFOR e Departamento de Química Orgánica da Universidad de Buenos Aires pelas análises de RMN e espectrometria de massas realizadas.

Aos membros da banca, pela avaliação e contribuição para a melhoria do trabalho realizado.

À todos os alunos, professores e técnicos do Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais e Sintéticos, incluindo os integrantes dos laboratórios de Química Farmacêutica, Farmacognosia e Central Analítica, pela amizade, aprendizado e boa convivência.

Aos alunos e professores da Universidad de Buenos Aires pela atenção, carinho, assistência e ensinamentos.

Aos meus orientadores, Professor Eloir e Professor Jorge pelos ensinamentos, paciência, dedicação e esforços para meu crescimento e formação profissional.

À minha família, amigos de infância, de vida e de faculdade que me incentivaram e de alguma forma participaram na conclusão deste trabalho.

À Deus.





## RESUMO

Visando à obtenção de novos compostos de interesse terapêutico, o trabalho tem como objetivo o isolamento e elucidação estrutural de substâncias obtidas de organismos marinhos de ocorrência no sul do Brasil e Argentina. O estudo químico das espécies do Brasil foi guiado pela avaliação da atividade anti-herpética, antimicrobiana, antiprotozoária e atividade citotóxica dos extratos e frações. Foram selecionados para investigação o octocoral *Leptogorgia punicea* coletado em ilhas da costa de Florianópolis, outro octocoral ainda não identificado e duas esponjas coletadas no sul da Argentina. O extrato em hexano (HE) do octocoral *L. punicea* inibiu o crescimento das cepas de *S. aureus* e *C. albicans* no ensaio de difusão em disco e ainda, o extrato em diclorometano apresentou uma inibição de 38,8% para as formas epimastigotas de *T. cruzi*. Cinco novas substâncias, 6 $\beta$ -acetóxi-colestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,19-triol, 6 $\beta$ -acetóxi-colestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ ,11 $\beta$ -triol, 6 $\beta$ -acetóxi-colest-22-en-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,11 $\beta$ -triol, 24-nor-6 $\beta$ -acetóxi-colest-22-en-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,11 $\beta$ -triol e 6 $\beta$ -acetóxi-colest-22-en-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,18-triol, denominadas de punicinóis A-E, foram isoladas do extrato etanólico do octocoral *L. punicea* e suas estruturas elucidadas por métodos espectroscópicos e espectrometria de massas de alta resolução. As substâncias isoladas apresentaram atividade citotóxica para a linhagem de câncer de pulmão de células não-pequenas (A549), com atividades mais promissoras para as substâncias, punicinol A e punicinol B com  $CI_{50}$  de 9,7  $\mu$ M e 9,6  $\mu$ M. Das espécies coletadas na Argentina, foram isolados cinco substâncias, dentre elas um bromoindol (6-bromo-1H-indol-3-carboxaldeído), o p-hidróxi benzaldeído, o nucleosídeo timidina em mistura com uracila e um sesquiterpeno denominado (+)-aromadendran-5-ol.

**Palavras-chave:** Octocoral, *Leptogorgia punicea*, esteroides polioxigenados.



## ABSTRACT

**MORITZ, M.I.G.,** CHEMICAL INVESTIGATION OF MARINE ORGANISMS OF SOUTH BRAZIL AND ARGENTINA.

Marine organisms have provided a wide range of new compounds with diverse carbon skeletons and valuable biological activities. Aiming to obtain new compounds of therapeutic interest, the isolation and structural elucidation of substances obtained from marine organisms occurring in southern Brazil and Argentina was performed. The isolation was guided by the evaluation of antiviral, antimicrobial and antiprotozoal activity of the extracts, fractions and isolated compounds obtained in the process. The octocoral *Leptogorgia punicea* was selected for the research, collected on islands off the coast of Florianópolis, besides another unidentified octocoral and two sponges collected in Southern Argentina. As a result of the octocoral *L. punicea*, the hexane extract (HE) inhibited the growth of strains of *S. aureus* and *C. albicans* in the disk diffusion assay and also the dichloromethane extract showed an inhibition of 38.8% for epimastigotes of *T. cruzi*. Five new substances, 6 $\beta$ -acetoxycholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,11 $\beta$ -triol; 6 $\beta$ -acetoxycholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,18-triol; 6 $\beta$ -acetoxycholest-22E-en-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,11 $\beta$  -triol; 24-nor-6 $\beta$ -acetoxycholest-22E-en-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,11 $\beta$ -triol and 6 $\beta$ -acetoxycholest-22E-en-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,18-triol, named punicinols A-E, were isolated from ethanol extract of octocoral *Leptogorgia punicea*. The five compounds induced *in vitro* cytotoxic effects against lung cancer A549 cells, while punicinols A and B were the most active, with IC<sub>50</sub> values of 9.7  $\mu$ M and 9.6  $\mu$ M, respectively. The study with marine organisms from Argentina resulted in the isolation of five substances including one bromoindole (6-bromo-1H-indole-3-carboxaldehyde), p-hydroxy benzaldehyde, the thymidine nucleoside, uracil and a sesquiterpene called (+)aromadendran-5-ol.

**Keywords:** Octocorals, *L.punicea*, polyoxygenated steroids.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número de novos fármacos aprovados por ano representado segundo sua origem.....	27
Figura 2: a. citarabina. b. <i>Tethya crypta</i> . c. vidarabina.....	30
Figura 3: a. ziconotida ( $\omega$ -conotoxina MVIIA). b. <i>Conus magus</i> . c. <i>Ecteinascidia turbinata</i> . d. trabectedina (ecteinascidina-743).....	30
Figura 4: a. <i>Pseudopterogorgia elisabethae</i> . b. pseudopterossina A, c. cefalostatina 1 (R = H). d. Esqualamina.....	31
Figura 5: A.) <i>Leptogorgia punicia</i> : Escleritos. B.) Ramo.....	41
Figura 6: 1.) lotoxina 2.) pseudopterolideio.....	42
Figura 7: 3.) leptodienona A 4.) leptodienona B.....	42
Figura 8: 5.) 11 $\beta$ , 12 $\beta$ -epoxipukalideio; 6.) homarina; 7.) malongagenona A.....	43
Figura 9: 8-9.) Esteroides polioxygenados de <i>Leptogorgia sarmentosa</i> .....	44
Figura 10: 10.) punicina.....	44
Figura 11: RMN de $^1\text{H}$ do extrato acetona de <i>L. punicia</i> .....	51
Figura 12: <i>Leptogorgia punicia</i> na fenda da Ilha das Aranhas a 12 m de profundidade.....	51
Figura 13: Resumo das metodologias empregadas para o isolamento das substâncias F3 e F4.....	52
Figura 14: a. Cromatografia de camada delgada da fração F1 da coluna LP1. b. Cromatografia de camada delgada das frações da coluna LP2 (Fr.17-24).....	53
Figura 15: CCD em gel de sílica das substâncias F3 e F4 e demais frações da coluna de CLAE (LP3).....	53
Figura 16: Resumo das metodologias empregadas para o isolamento das substâncias F3-F7.....	54
Figura 17: Cromatograma de CLAE da fração F2.....	55
Figura 18: Espectro de HSQC/DEPT da substância F3 em $\text{CDCl}_3$ .....	56
Figura 19: Esqueleto comum dos esteroides: ciclopentanoperidrofenantreno.....	56
Figura 20: Ampliação do RMN de $^1\text{H}$ com sinais das metilas em $\delta$ 0,86 (d), $\delta$ 0,87 (d), $\delta$ 0,92 (d), $\delta$ 0,91 (s) e 1,38.....	59
Figura 21: Estrutura química do colestano.....	59
Figura 22: Espectro de massas MS2 por ESI da substância F3 e fórmulas moleculares possíveis para a massa selecionada e seus fragmentos.....	59
Figura 23: Principais correlações de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY e HMBC do anel A da substância F3.....	60
Figura 24: Principais correlações de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY e HMBC do anel B da substância F3.....	61
Figura 25: Principais correlações de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY e HMBC do anel C e cadeia lateral da substância F3.....	61
Figura 26: Região do espectro de RMN $^1\text{H}$ da substância F4 ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) que representa os sinais dos H-3, H-6 e H-11.....	62

Figura 27: Padrão de desdobramento para a hidroxila em 3, 6 e 11 $\alpha$ ou $\beta$ descrito na literatura (KASAL ET AL., 2010).....	63
Figura 28: Correlações chaves de NOE da substância F3 - 6 $\beta$ -acetóxi- colestano-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 11 $\beta$ -triol em representação espacial e no plano.....	63
Figura 29: Espectro de massas MS2 por ESI da substância F4.....	64
Figura 30: Espectro de HSQC/DEPT (CDCl <sub>3</sub> ; 500/125 MHz) da substância F4 indicando correlações entre os hidrogênios $\delta$ 3,73 e $\delta$ 3,61 com o carbono em $\delta$ 61,2.....	65
Figura 31: Ampliação do RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ; 500 MHz) com sinais das metilas em $\delta$ 0,86 (d), $\delta$ 0,87 (d), $\delta$ 1,03 (d) e $\delta$ 1,15 (s).....	65
Figura 32: Estrutura da substância F4.....	66
Figura 33: Espectro de massas por ESI da substância F5.....	66
Figura 34: Principais correlações de <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY e HMBC da cadeia lateral da substância F5.....	67
Figura 35: Espectro de massas por ESI da substância F6.....	67
Figura 36: Ampliação do RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ; 500 MHz) com sinais dos hidrogênios da olefina em $\delta$ 5,13 e $\delta$ 5,26 da substância F6.....	68
Figura 37: Estrutura da substância F6 com correlações de <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY e HMBC.....	68
Figura 37: Espectro de experimento de MS2 (CE 10 EV, argônio) por ESI para o íon [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> m/z 480,00 da substância F6.....	69
Figura 39: Espectro de massas de alta resolução por ESI da substância F7.....	69
Figura 40: Ampliação de espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ; 500 MHz) na região da olefina da substância F7.....	70
Figura 8: Ampliação do RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ; 500 MHz) com sinais das metilas em 0,86 (d), 1,10 (d) e 1,15 (s).....	70
Figura 42: Espectro de experimento de MS2 (CE 10 EV, argônio) por ESI para o íon [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> m/z 494,00 da substância F7.....	71
Figura 43: Estruturas das substâncias F3-F7 denominadas punicinóis A-E.....	71
Figura 44: Estruturas de esteroides polioxigenados isolados de octocorais.....	72
Figura 45: Relação estrutura atividade baseada em resultados de citotoxicidade (CI <sub>50</sub> ) determinadas por CARVALHO et al., 2011 com substituintes também presentes nos punicinóis A-E.....	75
Figura 46: Diterpenos do tipo dolabelano de <i>Convexella magelhaenica</i> .....	80
Figura 47: Alcaloide $\beta$ -carbonílico de <i>Lignopsis spongiosum</i> .....	80
Figura 48: 9,11-Secoesteroides de <i>Tripalea clavaria</i> .....	80
Figura 49: Luridosídeo a (21) de <i>Cosmasterias lurida</i> e sulfato de 5 $\alpha$ -colestano-3 $\beta$ ,5,6 $\beta$ ,15 $\alpha$ ,26-pentol de <i>Luidia ludwigi</i> .....	81
Figura 50: Alcaloide tripeptídico bromado <i>Cliona chilensis</i> .....	81
Figura 51: Pseudoanchinazinas A-C de <i>Clathria</i> sp.....	82
Figura 52: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância IM19 em CDCl <sub>3</sub> (500 MHz).....	88
Figura 53: Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância IM19 em CDCl <sub>3</sub> (500 MHz).....	88

Figura 54: Ampliação do espectro de HMBC da substância IM19.....	89
Figura 55: Estruturas relacionadas encontradas na literatura 1- hidroxialloaromadendreno e 10βhidroxi-δ1-2-aromadendrenol.....	89
Figura 56: Estrutura Isolada Da Planta <i>Conocephalum conicum</i> (-)- aromadendran-5-ol.....	90
Figura 57: Substância IM19 e seus valores de <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H.....	90
Figura 58: Substância isolada de <i>Sinularia lochmodes</i> , lochmolina B.....	91
Figura 59: Espectro de NOESY da substância IM19 em acetona-d <sub>6</sub> .....	92
Figura 60: Representação da estereoquímica relativa da substância IM19 com valores de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C em acetona-d <sub>6</sub> .....	92
Figura 61: Espectro de massas de alta resolução por ESI (modo positivo) da substância IBC1.....	93
Figura 62: Dados de RMN de <sup>1</sup> H da Substância IBC1 e de outros dois indóis da literatura para comparação.....	94
Figura 63: Experimento CID de MS2 da molécula cationizada [M+H] m/z 224.....	94
Figura 64: Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz) da substância EGC1.....	95
Figura 65: Estrutura da substância EGC1 - p-hidróxi-benzaldeído.....	96
Figura 66: Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H em MeOD (500 MHz) da substância EGC2.....	96
Figura 67: Ampliação do espectro de RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz) em MeOD da substância EGC2 com indicações da presença de mistura.....	97
Figura 68: HMBC em MeOD da substância EGC2 (125/500 MHz).....	97
Figura 69: Estrutura das substâncias timidina e uracila da mistura EGC2 e seus valores de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C e dados de <sup>13</sup> C da literatura para as substâncias...98	98





## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Ensaio antibacteriano e antifúngico com a metodologia de difusão em disco.....	33
TABELA 2: Citotoxicidade e atividade antiherpética dos extratos de invertebrados marinhos.....	33
TABELA 3: Atividade antiprotozoária dos extratos de invertebrados marinhos em porcentagem de inibição dos extratos.....	34
TABELA 4: Locais e datas de coleta dos invertebrados marinhos.....	45
TABELA 5: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ das substâncias F3-F7 em $\text{CDCl}_3$ (125 MHz).....	57
TABELA 6: Dados de RMN de $^1\text{H}$ das substâncias F3-F7 em $\text{CDCl}_3$ (500 MHz).....	58
TABELA 7: Ensaio antibacteriano e antifúngico com metodologia de difusão em disco.....	73
TABELA 8: Ensaio citotóxico e antiviral da fração F2.....	73
TABELA 9: Ensaio <i>in vitro</i> de citotoxicidade contra linhagem de células não pequenas de pulmão (A549) depois de 24 e 48 h de tratamento. apresentação de valores através de desvio padrão de três experimentos independentes.....	73
TABELA 10: Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ da substância IM19 e RMN de $^1\text{H}$ da substância (-)-aromadendran-5-ol isolada de <i>Conocephalum conicum</i> .....	89



## LISTA DE ABREVIATURAS

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade  
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana  
FDA – *Food and Drug Administration*  
DNA – Ácido Desoxirribonucleico  
CI<sub>50</sub> – Concentração Inibitória Média  
RMN – Ressonância Magnética Nuclear  
<sup>1</sup>H-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio  
<sup>13</sup>C-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C  
CCD – Cromatografia de Camada Delgada  
IV – Infravermelho (Espectroscopia de Infravermelho)  
P.A. – Para Análise  
UV – Ultravioleta  
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
COSY – *Correlated Spectroscopy* (Espectroscopia de correlação <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H)  
HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence*  
DEPT – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*  
HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*  
ESI – *Electrospray (Ionização por Electrospray)*  
P.F. – Ponto de Fusão  
F.M. – Fase móvel  
CDCl<sub>3</sub> – Clorofórmio Deuterado  
Me – Metila  
*J* – Constante de Acoplamento  
CID – Collision-Induced Dissociation



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
1.1	IMPORTÂNCIA DE PRODUTOS NATURAIS MARINHOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS .....	27
1.2	TRIAGEM PARA SELEÇÃO DE ORGANISMOS MARINHOS COM ATIVIDADES ANTI-INFECCIOSAS .....	32
1.3	REVISÃO DE LITERATURA.....	35
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
CAPÍTULO 1 – Estudo bioguiado de <i>Leptogorgia punicea</i> .....		<b>39</b>
<b>3</b>	<b>ESTUDO BIOGUIADO DE <i>Leptogorgia punicea</i> .....</b>	<b>41</b>
3.1	REVISÃO DE LITERATURA.....	41
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
4.1	COLETA DO MATERIAL .....	45
4.2	PROCEDIMENTOS GERAIS .....	45
4.2.1	<i>Cromatografia em camada delgada</i> .....	45
4.2.2	<i>Cromatografia em coluna</i> .....	46
4.2.3	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i> .....	46
4.2.4	<i>Análise Instrumental</i> .....	46
4.3	PREPARAÇÃO DE EXTRATOS DE <i>LEPTOGORGIA PUNICEA</i> .....	46
4.4	ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS F3 E F4 DE <i>LEPTOGORGIA PUNICEA</i> .....	47

4.5	ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS F3, F4, F5, F6 E F7 DE <i>LEPTOGORGIA PUNICEA</i> .....	48
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
5.1	RESULTADOS COM O OCTOCORAL <i>LEPTOGORGIA PUNICEA</i> .....	51
5.2	ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS DA FRAÇÃO ATIVA.....	52
5.3	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL.....	55
5.3.1	<i>Substância F3</i> .....	55
5.3.2	<i>Substância F4</i> .....	64
5.3.3	<i>Substância F5</i> .....	66
5.3.4	<i>Substância F6</i> .....	67
5.3.5	<i>Substância F7</i> .....	69
	CAPÍTULO 2 – INVESTIGAÇÃO COM ORGANISMOS MARINHOS COLETADOS NA ARGENTINA .....	76
6	<b>INVESTIGAÇÃO COM ORGANISMOS MARINHOS COLETADOS NA ARGENTINA .....</b>	<b>78</b>
6.1	REVISÃO DE LITERATURA.....	78
7	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>82</b>
7.1	COLETA .....	82
7.2	OCTOCORAL L27 .....	82
7.2.1	<i>Preparação dos Extratos</i> .....	82
7.2.2	<i>Isolamento e identificação dos compostos</i> .....	82
7.2.3	<i>Reações de esterificação</i> .....	83
7.2.4	<i>RMN em acetona-d<sub>6</sub></i> .....	84
7.3	ESPONJA IB3.....	84

7.3.1	<i>Preparação dos Extratos.....</i>	84
7.3.2	<i>Isolamento e identificação dos compostos .....</i>	84
7.4	ESPONJA EG13 .....	84
7.4.1	<i>Preparação dos Extratos.....</i>	84
7.4.2	<i>Isolamento e identificação dos compostos .....</i>	84
8	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO - ORGANISMOS MARINHOS</b>	
	<b>ARGENTINOS.....</b>	<b>86</b>
8.1	OCTOCORAL L27.....	86
8.1.1	<i>Elucidação Estrutural da substância IM19.....</i>	86
8.2	ESPONJA IB3 .....	91
8.2.1	<i>Preparação de extratos e isolamento .....</i>	92
8.2.2	<i>Elucidação Estrutural da substância IBC1 .....</i>	92
8.3	ESPONJA EG13 .....	93
8.3.1	<i>Preparação de extratos e isolamento .....</i>	94
8.3.2	<i>Elucidação Estrutural das substâncias EGC1 e EGC2.....</i>	94
9	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>102</b>
	APÊNDICE I – ESPECTROS DE RMN .....	114





## APRESENTAÇÃO

Os organismos marinhos são fontes de metabólitos e apresentam alto potencial biológico e diversidade estrutural. No entanto, a investigação desses organismos aconteceu de forma tardia em comparação aos organismos terrestres principalmente pelas dificuldades de coleta e recoleta. Ainda, após a identificação de compostos químicos interessantes ou de atividade constata-se frequentemente uma dificuldade de identificação do organismo. Muitas espécies da costa do Brasil e, em geral da América do Sul, ainda permanecem sem identificação, caracterização, conhecimento de seus constituintes e suas atuações tanto no ambiente em que vivem, quanto em relação às ações farmacológicas.

O presente trabalho tem como objetivo o isolamento de novas substâncias a partir de organismos marinhos de ocorrência na região sul do Brasil e da Argentina, com potencial interesse terapêutico. Essa linha de trabalho foi iniciada na Universidade Federal de Santa Catarina com o apoio da cooperação internacional, especificamente com o grupo de pesquisa do Departamento de Química Orgânica da Universidad de Buenos Aires, Argentina, liderado pelo Prof. Jorge Alejandro Palermo, o qual tem acompanhado o estabelecimento e desenvolvimento dessa linha de pesquisa, com o apoio do CNPq (Programa CNPq/PROSUL, Processos CNPq 490.230/05-9 e 490496/2007-5).

Os organismos marinhos investigados foram localizados, identificados e coletados com o apoio dos taxonomistas, especialmente Paulo Horta (algas), João Carraro (esponjas), Alberto Lindner e Carlos Pérez (corais). O grupo de pesquisa possui a autorização para Coletas e processamento de organismos marinhos do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO (Autorização anual para atividades com finalidade científica). Para a seleção das espécies a serem estudadas sob o ponto de vista químico, os extratos foram submetidos a uma triagem frente às atividades antimicrobiana, antileishmania, antitripanossoma e anti-herpética. Essas atividades foram avaliadas nesta Universidade nos laboratórios coordenados pelos professores: Dr. Mário Steindel (laboratórios de Protozoologia da UFSC), Dr. Flávio Henrique Reginatto (Laboratório de Farmacognosia da UFSC), Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões (Laboratório de Virologia da UFSC).

A introdução do trabalho apresenta uma visão geral sobre a triagem realizada, bem como uma revisão sucinta sobre a importância de produtos naturais marinhos para o desenvolvimento de fármacos, além dos resultados de triagem obtidos anteriormente a este trabalho. Na sequência são apresentados os objetivos do trabalho seguido dos resultados, discussões e procedimentos experimentais os quais estão divididos em dois capítulos: No primeiro capítulo são apresentados os resultados e discussão obtidos com o octocoral *Leptogorgia*

*punicea*, do qual foram isoladas cinco substâncias inéditas. No capítulo 2 são apresentados os resultados e discussão obtidos com outros organismos marinhos coletados na costa da Argentina e estudados durante o estágio doutoral realizado na *Universidad de Buenos Aires*. Nos anexos, os artigos submetidos, aceitos e publicados relacionados com esse trabalho são apresentados:

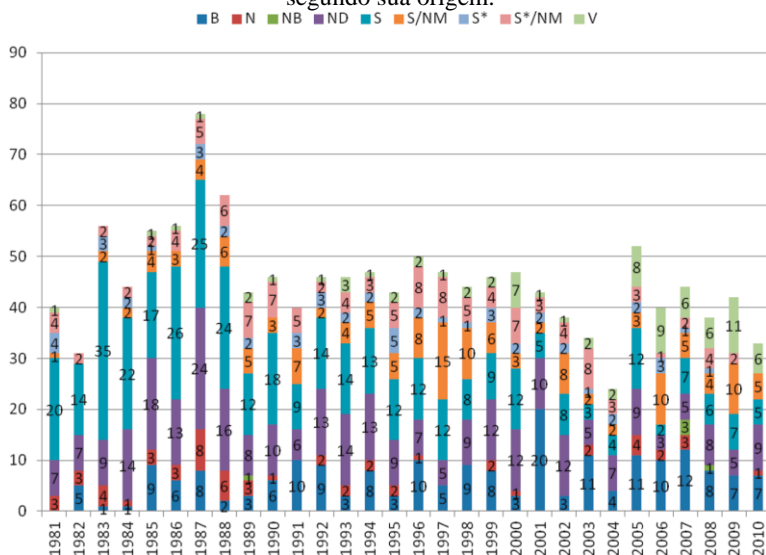
- 1- Uma revisão abrangendo aspectos químicos e biológicos de octocorais no Brasil, artigo aceito em maio de 2014 na *Revista Brasileira de Farmacognosia*;
- 2- A publicação conjunta com os laboratórios associados apresentando resultados do processo de triagem, artigo publicado em maio de 2013 na revista *Molecules*;
- 3- Publicação conjunta sobre o octocoral *Carijoa riseii*, publicado em 2012 na revista *Latin American Journal of Pharmacy*;
- 4- Publicação conjunta do estudo da esponja *Petromica citrina*, publicada na Revista *Marine Drugs* em 2013;
- 5- Publicação submetida em agosto de 2014 para a revista *Marine Drugs*, apresentando resultados sobre o estudo químico do octocoral *Leptogorgia punicea*.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 IMPORTÂNCIA DE PRODUTOS NATURAIS MARINHOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

A descoberta de novos fármacos através de produtos naturais têm sido de grande importância na terapêutica através dos anos. Por exemplo, a obtenção da morfina em 1804, alcaloide isolado através da planta *Papaver somniferum* (Papaveraceae) originou os primeiros hipnoanalgésicos, o que, além de propiciar a melhor compreensão do mecanismo de ação analgésica, também serviu de modelo para obtenção de centenas de derivados. De forma similar, os antimaláricos mais importantes tiveram como protótipo a quinina, isolada da planta *Cinchona* sp. (Rubiaceae), assim como os anestésicos locais tiveram como modelo a cocaína, isolada de *Erythroxylum coca* (Erythroxylaceae) (BARREIRO; BOLZANI, 2009; SCHENKEL et al., 2003). Nos últimos 30 anos, apesar do avanço da síntese de pequenas moléculas, os produtos naturais e/ou estruturas baseadas em produtos naturais ainda apresentam grande importância na descoberta de novos fármacos e no processo de desenvolvimento, como é possível observar no gráfico de Newman e Cragg (2012) (Figura 1).

Figura 1: Número de novos fármacos aprovados por ano representado segundo sua origem.



Fonte: Newman; Cragg (2012)

No gráfico os novos fármacos foram representados pelos códigos a seguir: B: para aqueles de origem biológica, usualmente peptídeos >45 resíduos; N: produto natural; NB: produto natural botânico; ND: derivado de produto natural; S: sintética; S/NM: sintética e mimética de um produto natural; S\*: sintética baseada em um farmacóforo de produto natural; S\*/NM: sintética, baseada em um farmacóforo e mimética de produto natural e V: vacina.

Proporcionalmente, os fármacos aprovados nos últimos anos de origem não-sintética representam mais de 50% do total de aprovações quando consideradas as categorias: vacinas (V), biológicos (B), produto natural botânico (NB) e derivados de produtos naturais (ND). Uma das razões para a descoberta de novos fármacos de origem não sintética é o desenvolvimento, através dos anos, da triagem pela química combinatória e das bibliotecas virtuais (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Em relação aos fármacos antitumorais, essa importância é mais evidente, sendo que aproximadamente 75% dos fármacos aprovados para uso são não-sintéticos (NEWMAN; CRAGG, 2012). Por outro lado, mesmo com anos de estudos incessantes, menos de 10% da biodiversidade mundial teve seu potencial biológico analisado e muitas doenças ainda não apresentam opções eficientes para tratamento (DIAS et al., 2012, MOLINSKI et al., 2009).

O Brasil possui cerca de 8.000 km de costa, a segunda maior do mundo depois da Austrália, e apresenta geograficamente diferenças climáticas e ecológicas, o que lhe confere grande variedade na fauna e flora marinhas, representando uma fonte potencial de novos compostos bioativos. Por volta de 1960, houve grande investimento por parte de indústrias farmacêuticas na busca de substâncias bioativas a partir dos organismos marinhos (BERLINCK et al. 2004). Além da popularização do mergulho autônomo e do desenvolvimento de equipamentos para coleta em maiores profundidades, a descoberta de grandes quantidades de prostaglandinas em um octocoral (*Plexaura homomalla*) ao final da década de 60, despertou o interesse de muitos pesquisadores (WEINHEIMER & SPRAGGINS, 1969). Em virtude da constatação do amplo potencial biológico dos produtos naturais de origem marinha, aliada a sua variedade estrutural e o desenvolvimento de bioensaios *in vitro*, ocorreu, nos últimos anos, um aumento significativo no número de grupos de pesquisa em todo o mundo, resultando em mais de 18.000 substâncias identificadas, incluindo acetogeninas, policetídeos, terpenos, alcaloides, peptídeos, entre outros, com um destaque para o aumento na obtenção de substâncias provenientes de micro-organismos marinhos (AVILA et al. 2008; FAULKNER et al. 2002; BLUNT et al. 2011; BLUNT et al. 2014).

No Brasil, apesar do extenso litoral, da biodiversidade marcante, bem como a existência de tradição na pesquisa de produtos naturais, são poucos os grupos de pesquisa que se dedicam à investigação de organismos marinhos. A necessidade da investigação dessa biodiversidade é realçada pelas mudanças climáticas em curso, podendo levar ao desaparecimento de espécies.

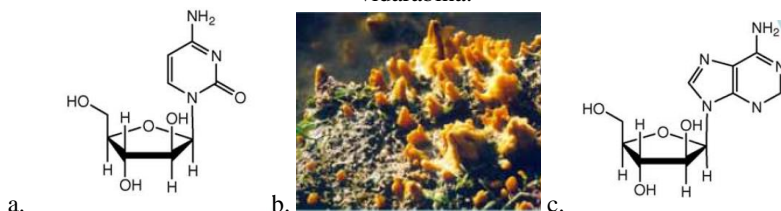
No estudo de organismos marinhos, a sistemática de trabalho consiste na coleta dos organismos, realização dos ensaios biológicos, estudo da composição química e identificação dos organismos, a qual nem sempre é realizada antes da investigação química ou biológica, tal como ocorre com espécies vegetais.

Dentre os organismos marinhos, o potencial biotecnológico dos invertebrados têm atraído os cientistas e a indústria farmacêutica pelo mundo. As esponjas são, até o presente, os maiores provedores de compostos bioativos, entretanto, os cnidários também têm apresentado metabólitos secundários como diterpenos, sesquiterpenos e esteroides com resultados promissores principalmente na inibição do HIV, atividade citotóxica, anti-inflamatória, antitumoral e atividade antimicrobiana, assim como respostas cardíacas e vasculares (PALERMO, 2003; ROCHA et al., 2011).

A primeira publicação abrangendo o estudo químico de um organismo marinho brasileiro foi de Tursch e colaboradores, Professor da *Université libre de Bruxelles*, Bélgica, o qual reporta o isolamento do colesterol, da espécie de ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* em 1963. Os esteroides são metabólitos recorrentes em organismos marinhos e o colesterol e outros esteroides mono-oxigenados são os mais abundantes. Além disso, outras formas também podem ocorrer, como os esteroides polioxigenados e seus derivados acetilados e sulfatados (LI et al. 2012; SARMA et al. 2009). Os esteroides polioxigenados isolados de diferentes invertebrados marinhos vêm apresentando resultados promissores em ensaios frente às células tumorais de diferentes linhagens e atividade antiviral (GARRIDO et al. 2000; BOONANANWONG et al. 2008; CHEN et al. 2011).

Os estudos químicos de invertebrados marinhos começaram no final da década de 60, com destaque na descoberta de um nucleosídeo sintético, a citarabina (arabinosil-citosina) (Figura 2), obtido após modificações estruturais na molécula espongotimidina A isolada da esponja *Tethya crypta* (Figura 2). A citarabina foi aprovada pelo FDA em 1969 (MAYER, 2010) e no Brasil, seu uso também foi aprovado pela Anvisa e é indicada para o tratamento de leucemias, com utilização na terapêutica até a atualidade (BRASIL, 2014). A citarabina é um agente citotóxico atuando na fase S do ciclo celular inibindo tanto a polimerase quanto a síntese do DNA. Da mesma esponja, foi isolada a espongouridina, nucleosídeo que foi modelo para a síntese da vidarabina (Figura 2) (arabinofuranosiladenina), inibidor da polimerização e síntese do DNA viral do *Herpes simplex*, *Vaccinia virus* e *Varicella zoster* (MAYER, 2010).

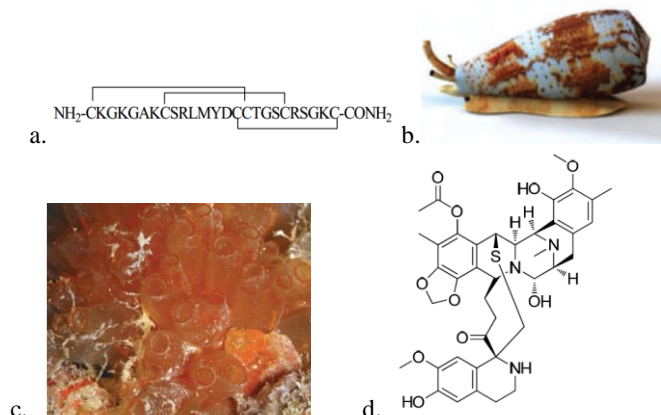
Figura 2: a. Estrutura da citarabina; b. Esponja *Tethya crypta*; c. vidarabina.



Fonte: Mayer e colaboradores (2010).

O primeiro fármaco aprovado pelo FDA para uso nos Estados Unidos com estrutura totalmente igual ao isolado de um organismo marinho foi em 2004. A ziconotida (Prialt<sup>®</sup>), um polipeptídeo sintético idêntico à ω-conotoxina MVIIA, um peptídeo originário do molusco marinho *Conus magus* (Figura 3), foi aprovada para o uso no tratamento da dor crônica. A trabectedina (Yondelis<sup>®</sup>), derivado sintético da ecteinascidina-743, aprovada em 2007 pela Agência Europeia de Medicamentos, foi a primeira substância de origem marinha aprovada para utilização como antitumoral e é utilizada para o tratamento de sarcoma de tecidos moles e de câncer de ovário (EUROPEAN COMMISSION, 2014). A ecteinascidina-743 foi isolada do tunicado *Ecteinascidia turbinata* (Figura 3) (MOLINSKI et al., 2009, DIAS et al., 2012).

Figura 3: a. ziconotida (ω-conotoxina MVIIA). b. *Conus magus*. c. *Ecteinascidia turbinata*. d. trabectedina (ecteinascidina-743)



Fonte: Mayer e colaboradores (2010).

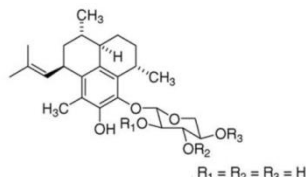
A importância da investigação de cnidários tornou-se evidente em 1978, com a descoberta proveniente do octocoral *Plexaura homomalla*, de grandes quantidades de prostaglandinas. Esse fato despertou um grande interesse entre os laboratórios de pesquisa e indústrias farmacêuticas. Essa descoberta propiciou um avanço nos estudos das prostaglandinas, substâncias essas que

exercem várias ações metabólicas como os processos fisiológicos e patológicos de vasodilatação ou vasoconstrição, hiperalgesia, contração ou relaxamento da musculatura brônquica e uterina; aumento do fluxo sanguíneo renal; proteção da mucosa gástrica e inibição da secreção ácida também no estômago; resposta imunológica; regulação de atividade quimiotática; progressão metastática; função endócrina, entre outras (COSTA-LOTUFO, et al., 2009).

As pseudopterossinas, glicosídeos de diterpenos, também isoladas de um octocoral, *Pseudopterogorgia elisabethae* (Figura 4), apresentam potente ação anti-inflamatória e analgésica, seus estudos clínicos chegaram até a fase II (LOOK et al. 1986; MAYER, 2010). Uma mistura parcialmente purificada de *Pseudopterogorgia elisabethae* foi o primeiro produto marinho comercializado como cosmético (NEWMAN & CRAGG, 2004).

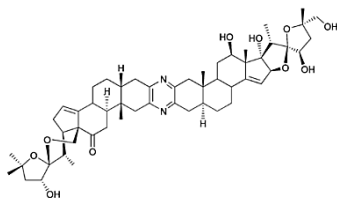
Um dos mais poderosos agentes inibidores de crescimento celular, um dímero esteroidal chamado cefalostatina 1 (Figura 4), foi isolada de um anfioxo marinho, *Cephalodiscus gilchristi*. Essa substância serviu como protótipo para diversas cefalostatinas ativas (SALVADOR et al. 2013, PETTIT et al. 1988). Os esteroides são geralmente utilizados na terapêutica, principalmente como anti-inflamatórios, atuando no controle hormonal e como contraceptivo, entretanto, nas últimas décadas, as substâncias com núcleo esteroidal, vêm demonstrando um potencial de atuação como antitumoral (STONIK, 2001).

Figura 4: a. *Pseudopterogorgia elisabethae*. b. pseudopterossina A, c. cefalostatina 1 (R = H). d. Esqualamina.



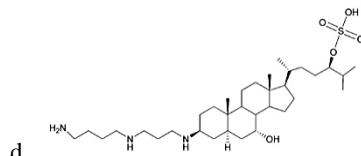
b.

Fonte: Mayer e colaboradores (2010).



c.

Fonte: Salvador e colaboradores (2013).



d.

Em uma revisão de 2013, Salvador e colaboradores, descrevem os esteroides de origem natural e de origem semissintética que apresentam alguma atividade antitumoral. Dentre eles estão destacados esteroides marinhos como as cefalostatina 1 citada acima e a esqualamina (Figura 4), um aminoesterol com atividade anti-angiogênese e que já está em fase II para a degeneração macular úmida e foi isolada do óleo do fígado do tubarão *Squalus acanthias* (SALVADOR et al. 2013).

## 1.2 TRIAGEM PARA SELEÇÃO DE ORGANISMOS MARINHOS COM ATIVIDADES ANTI-INFECCIOSAS

A triagem foi realizada com o objetivo de conhecer os organismos presentes no litoral brasileiro, principalmente no litoral de Santa Catarina. Foram testadas cerca de 100 espécies, principalmente abrangendo espécies de esponjas, corais e algas. As espécies de invertebrados marinhos foram coletadas no litoral de Santa Catarina (Ilha do Xavier, Ilha das Aranhas e Ilha do Arvoredo) por mergulho autônomo em 9-17 m de profundidade nos anos de 2010 e 2011. Os organismos coletados foram imediatamente congelados em freezer. Todas as espécies obtidas foram submetidas à extração por solventes distintos e com os extratos foram realizados os ensaios biológicos de triagem. A triagem foi realizada nos Laboratórios de Virologia Aplicada, Laboratório de Protozoologia e Laboratório de Farmacognosia, coordenados pelos pesquisadores Cláudia M. O. Simões, Mário Steindel e Flávio H. Reginatto e contou com a participação do mestrando Maiko L. Tonini, dos doutorandos Tatiana da Rosa Guimarães, Lucas L. Marostica e João L. F. Carraro e dos pesquisadores Éverson M. Bianco, Simone Q. Oliveira, Maria Tereza Rojo de Almeida e Caroline R. Borges.

Foram realizados ensaios de difusão em disco para testar as atividades antibacteriana e antifúngica de extratos e frações (100 mg/mL) frente a *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Os resultados obtidos considerados mais promissores são apresentados na tabela 1.

A atividade anti-herpética dos extratos das espécies coletadas foi avaliada frente ao vírus herpético do tipo 1 (HSV-1, cepa KOS), através do ensaio de inibição da formação do número de placas de lise, com cálculo dos valores de  $CI_{50}$ , visando selecionar as frações com potencial atividade anti-herpética e cálculo do índice de seletividade de cada amostra testada ( $IS = CC_{50}/CI_{50}$ ). Como controle positivo foi empregado o aciclovir. Os resultados promissores estão apresentados na tabela 2.



Tabela 1: Ensaio antibacteriano e antifúngico com a metodologia de difusão em disco.

Extratos/frações	Cepas bacterianas e fúngicas				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Cliona celata</i>	-	-	-	-	-
HE ( <i>Dragmaxia anomala</i> )	+	+	-	-	-
MAF ( <i>D. reticulatum</i> )	+++	-	-	-	+++
<i>Didemnum granulatum</i>	-	-	-	-	-
<i>Guitarra sépia</i>	-	-	-	-	-
BF ( <i>Haliclona</i> sp.)	++	++	+	-	+
HE ( <i>Leptogorgia punicea</i> )	++	-	-	-	++
MAR ( <i>Trachycladus</i> sp.)	-	+	-	-	-
DE ( <i>Tedania ignis</i> )	-	+	-	-	-

(-): não ativo; (+): 5-8 mm; (++) : 9-12 mm; (+++) : 13-16 mm; (++++): 17-20 mm. (Controles positivos: *S. aureus*: oxacilina (1 µg) 18-24 mm; *E. faecalis*: ampicilina (10 µg) >17 mm; *P. aeruginosa*: ceftazidina (30 µg) 22-29 mm; *E. coli*: ampicilina (10 µg) 16-22 mm; *C. albicans*: fluconazol (25 µg) >19 mm.) HE: extrato hexano; BF: fração *n*-butanol do extrato em etanol; MAF: extrato etanol; MAR: resíduo aquoso do extrato em metanol.; DE: extrato em diclorometano.

Tabela 2: Atividade anti-herpética dos extratos de invertebrados marinhos.

Extratos	HSV-1 (cepa KOS)
	IS
BF <i>Petromica citrina</i>	> 5
BF <i>Haliclona</i> sp.	11,92

Concentração dos extratos: 100-6,25 µg/mL; IS: índice de seletividade (=CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>); NI: nenhuma inibição. MAF: extrato metanol; HE: extrato hexano; MEAF: fração acetato de etila do extrato em etanol 40°; BF: fração *n*-butanol do extrato em metanol.

Os ensaios de atividade antiprotozoária foram realizados frente à *Leishmania braziliensis* (formas promastigotas) e *Trypanossoma cruzi* (formas epimastigotas). Estes resultados são apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Atividade antiprotozoária dos extratos de invertebrados marinhos em porcentagem de inibição dos extratos.

Extratos/frações		<i>Leishmania braziliensis</i> (promastigotas)	<i>Trypanosoma cruzi</i> (epimastigotas)
<i>Haliclona</i> sp.	HE	NI	14,57
	MEAF	NI	28,35
	MBF	43,61	33,00
	MAR	16,94	NI
<i>Tedania ignis</i>	DE	16,10	NI
	MBF	18,45	NI
	MAR	19,06	NI
	EAF	12,17	NI
<i>Dragmacidon reticulatum</i>	HE	24,15	11,42
	DE	NI	19,99
	MEAF	NI	21,28
	MAR	13,85	15,27
<i>Dragmaxia anomala</i>	HE	97,23	71,68
<i>Didemnum granulatum</i>	HE	NI	21,49
	MBF	17,89	NI
	MEAF	15,66	13,22
<i>Leptogorgia punicea</i>	HE	NI	19,25
	DE	NI	38,85
	MBF	NI	11,13
	AR	14,97	NI

Concentração dos extratos: 50 µg/mL; NI: nenhuma inibição; HE: extrato hexano; DE: extrato em diclorometano; BF: fração *n*-butanol do extrato em metanol; MEAF: fração acetato de etila do extrato em metanol; MBF: fração *n*-butanol do extrato em etanol 40°; MAR: extrato metanol; MAR: resíduo aquoso do extrato em metanol.

Os dados nas tabelas acima mostraram que o extrato em hexano (HE) de *L. punicea* inibiu o crescimento das cepas de *S. aureus* e *C. albicans* com halos de inibição de 9,5 mm para ambas as cepas no ensaio de difusão em disco e ainda, o extrato em diclorometano apresentou uma inibição de 38,8% para epimastigotas de *T. cruzi*.

Os resultados apresentados acima, referentes à triagem de atividades biológicas dos organismos marinhos estudados, foram utilizados para seleção da espécie a ser investigada quimicamente para o fracionamento bioguiado e também foram compilados em um manuscrito publicado na revista *Marine Drugs*: “Anti-Infective Potential Of Marine Invertebrates And Seaweeds From The Brazilian Coast” (BIANCO et al., 2013).

Dentre as espécies estudadas coletadas na costa de Santa Catarina, está a esponja incrustante *Dragmaxia anomal* e a esponja em fase de identificação do gênero *Haliclona*. Para as esponjas *D. anomala* e *Haliclona* sp., apesar de resultados interessantes quanto a atividade biológica de seus extratos brutos

(BIANCO et al., 2013), não foi possível determinar as suas substâncias ativas, principalmente pela complexidade do material utilizado.

### 1.3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 1.3.1 Ocorrência e estudos químicos e farmacológicos de octocorais (Filo Cnidaria) no Brasil

Os cnidários são animais invertebrados que se agrupam em cinco classes denominadas Hydrozoa (hidroides e caravelas), Staurozoa (medusas sésseis), Scyphozoa (água-vivas), Cubozoa (cubomedusas) e Anthozoa (corais, anêmonas e gorgônias), sempre aquáticos e geralmente marinhos (DALY et al., 2007). São os animais mais simples que apresentam células nervosas e órgãos sensoriais como os estatocistos (órgãos de equilíbrio) e ocelos (órgãos de fotossensibilidade) (GRIMMELIKHUIJZEN; WESTFALL, 1995). Como característica específica do Filo, os animais apresentam organelas com funções de defesa e de capturar alimentos chamados cnidocitos. A classe Anthozoa se divide ainda em duas subclasses, Hexacorallia (=Zoantharia) apresentando tentáculos e septos complexos em número de 6 ou múltiplos de seis e Octocorallia (=Alcyonaria) que apresentam oito tentáculos e oito mesentérios internos (DALY et al., 2007).

Os octocorais geralmente são organismos formadores de colônias e constituídos por pólipos com oito tentáculos pinados. Os pólipos surgem de um tecido basal, cenênquima, onde estão encaixados os escleritos, seu esqueleto calcário. Sua taxonomia é geralmente baseada na morfologia das colônias e estrutura e disposição dos escleritos. A subclasse Octocorallia apresenta três ordens descritas: Helioporacea (corais azuis), Pennatulacea (penas do mar) e Alcyonacea (corais moles e gorgônias) (BREEDY, 2009).

Dentro da subclasse Octocorallia estão contidas aproximadamente 3200 espécies de corais encontrados em todos os ambientes marinhos. Esses organismos podem ser encontrados tanto em águas rasas quanto em águas mais profundas (MCFADDEN et al., 2010).

No Brasil, os octocorais de águas profundas são ainda pouco conhecidos em comparação à fauna do Caribe (ARANTES et al., 2009; CASTRO et al., 2010). Atualmente, 107 espécies e/ou morfotipos são descritos para o Brasil, sendo que quatorze dessas espécies são endêmicas (CASTRO et al., 2010; OFWEGEN; HADDAD, 2011; ARANTES et al., 2006; PÉREZ et al., 2011; NEVES, 2010).

Os octocorais presentes na costa do Brasil que foram estudados quimicamente, ou que tiveram metabólitos secundários isolados ou que apresentaram algum potencial, são pertencentes às ordens Alcyonacea e

Pennatulacea. Na ordem Alcyonacea, as famílias Clavulariidae (*Carijoa riisei*), Nephtheidae (*Chromonephthea braziliensis* e *Neospongodes atlantica*), Ellisellidae (*Ellisella elongata* e *Nicella goreau*), Primnoidae (*Convexella magelhaenica*, *Dasytenella acanthina* e *Plumarella aculeata*), Acanthogorgiidae (*Acanthogorgia* sp.), Gorgoniidae (*Leptogorgia punicea*, *L. setacea*, *L. violacea* e *Phyllogorgia dilatata*), Plexauridae (*Bebryce* sp., *Heterogorgia uatumani*, *Muricea* sp., *Muriceides hirtus*, *Muriceopsis flavida*, *Paramuricea placomus*, *Placogorgia atlantica*, *Plexaurella dichotoma*, *Plexaurella regia* e *Swiftia exserta*), Anthothelidae (*Tripalea clavaria*), Coralliidae (*Corallium* sp.), e Paragorgiidae (*Paragorgia johnsoni*). Já na ordem Pennatulacea, estão as famílias Anthoptilidae (*Anthoptilum murrayi*), Virgulariidae (*Stylatula* spp. e *Virgularia presbytes*) e Renillidae (*Renilla reniformis* e *R. muelleri*) (ALMEIDA et al., 2014).

As espécies encontradas no Brasil que já foram estudadas estão descritas no artigo *Chemical and biological aspects of octocorals reported on the Brazilian coast*, publicado na Revista Brasileira de Farmacognosia, apresentado em anexo, onde estão descritas todas as substâncias já isoladas e suas atividades relatadas.

A química de produtos naturais do Brasil apresenta maior foco em esponjas, tunicados e algas pardas (BERLINCK et al., 2004), no entanto, são escassos os estudos com octocorais. Dos octocorais encontrados no Brasil, cerca de 100 espécies descritas, aproximadamente 30 espécies foram estudadas quimicamente e somente 13 espécies foram estudadas por grupos de pesquisa brasileiros (ALMEIDA et al. 2014). Os octocorais têm sido uma rica fonte de metabolitos secundários, a maioria deles derivados da via do mevalonato (BLUNT et al., 2005; ROCHA et al., 2011; LEAL et al., 2012). As famílias Gorgoniidae e Plexauridae, as mais abundantes no Brasil, têm demonstrado conter uma grande variedade dessa classe de substâncias, que incluem os esteroides, acetogeninas, sesquiterpenos e diterpenos. Uma série de revisões de produtos naturais marinhos, publicadas desde 2003 por Blunt e colaboradores e com a última edição em 2014, apresenta a evolução do estudo de corais e de outros organismos marinhos com o passar dos anos. Verifica-se ainda que seus metabolitos secundários estão geralmente envolvidos em interações ecológicas, atividades antimicrobianas, citotóxica, antiviral e anti-inflamatória (BLUNT et al. 2005; BLUNT et al. 2011; BLUNT et al. 2014; FAULKNER, 2002).

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de buscar por novos metabólitos secundários a partir de organismos de origem marinha de ocorrência na região sul do Brasil, os quais foram avaliados inicialmente quanto às suas atividades anti-herpética, antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária (especificamente contra *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*) e citotóxica, além da busca de novas substâncias de invertebrados marinhos de ocorrência na Argentina.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolamento e elucidação estrutural de componentes presentes em extratos da espécie marinha selecionada *Leptogorgia punicea*;
2. Obtenção dos compostos em quantidades adequados para realização de ensaios biológicos quanto às suas atividades anti-herpética, antitripanossoma, antileishmania, antimicrobiana e citotóxica.
3. Seleção de organismos marinhos da Argentina para estudo químico com vista à obtenção de compostos ativos.



## CAPÍTULO 1 – Estudo bioguiado de *Leptogorgia punicea*





### 3 ESTUDO BIOGUIADO DE *Leptogorgia punicea*

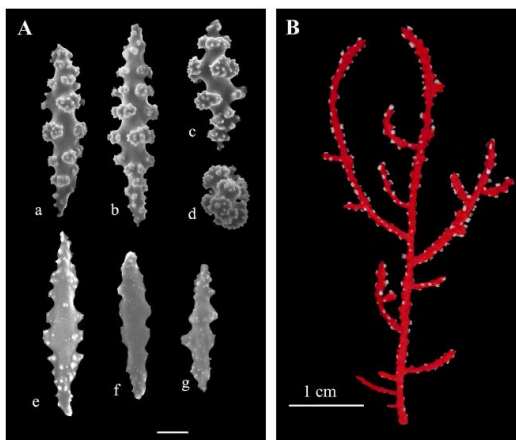
Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos com *Leptogorgia punicea*, espécie selecionada como o octocoral mais promissor através do processo de triagem descrito na introdução deste trabalho. A seguir é apresentada uma revisão sobre os estudos com espécies desse gênero.

#### 3.1 REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Leptogorgia* Milne Edwards & Haime, 1857 (Ordem Alcyonacea, Família Gorgoniidae), compreende a aproximadamente 54 espécies válidas, que se distribuem desde o oceano Atlântico, Caribe, Mar Mediterrâneo, sul da África e até o oceano Glacial Antártico. Anteriormente algumas espécies eram descritas como pertencentes ao gênero *Lophogorgia* Milne-Edwards, 1857 (BREEDY; GUZMAN, 2007).

As colônias de *L. punicea*, como os octocorais em geral, podem ser identificadas através da morfologia da colônia e de seus escleritos, sendo que a colônia se apresenta irregularmente pinada, com ramos curtos curvados para cima e pólipos em dupla série ao longo de ramos terminais (Figura 5). A espécie apresenta distribuição no Atlântico desde a Carolina do Norte, nos Estados Unidos (profundidades de 62-105m), Georgia, 20 m, sudeste da Flórida 27-73 m, Venezuela até o Brasil 1-69 m. A cor da colônia é geralmente roxa ou roxa avermelhada (DEVICTOR; MORTON, 2010).

FIGURA 5: *Leptogorgia punicea*: A.) Escleritos. B.) Ramo.

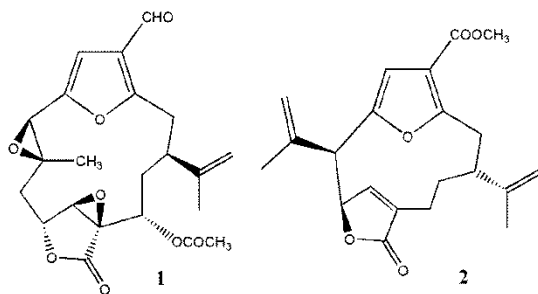


Fonte: Devictor; Morton, 2010.

A constituição química de espécies do gênero *Leptogorgia* abrange principalmente diterpenos de núcleo cembrano, esteroides polioxigenados e alcalóides. As primeiras substâncias isoladas do gênero *Leptogorgia* foram da classe dos diterpenos do tipo furanocembranolídeos, a substância lofotoxina (**1** – Figura 6), uma toxina neuromuscular, descrita em 1981 por Fenical e colaboradores para espécies do gênero *Leptogorgia* (três espécies coletadas no México: *L. alba*, *L. cuspidata* e *L. rigida*; e uma na Califórnia *L. chilensis*).

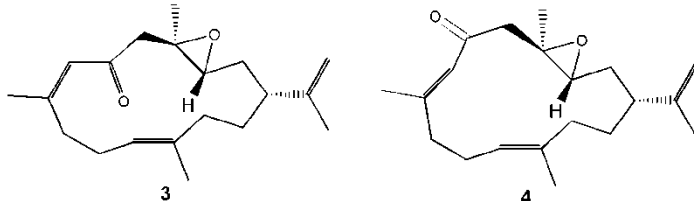
Após o isolamento da lofotoxina, outros seis furanocembranolídeos foram isolados de espécies coletadas no Panamá (*L. alba* e *L. rigida*) e também um pseudopterolídeo (**2** - Figura 6), esses compostos foram testados contra uma cepa resistente à cloroquina de *Plasmodium falciparum*, o que resultou em atividade moderada para três dos furanocembranolídeos isolados e uma atividade mais promissora para os compostos lofotoxina e pseudopterolídeo (GUTIERREZ, et al. 2005).

Figura 6: **1.**) Lofotoxina **2.**) pseudopterolídeo.



*Leptogorgia laxa*, coletada no México, apresenta em sua constituição furanocembranolídeos como os encontrados nas espécies anteriores e cembranos simples como a leptodienona A (**3**) e leptodienona B (**4**) (Figura 7) (ORTEGA et al. 2008).

Figura 7: **3.**) Leptodienona A **4.**) Leptodienona B.



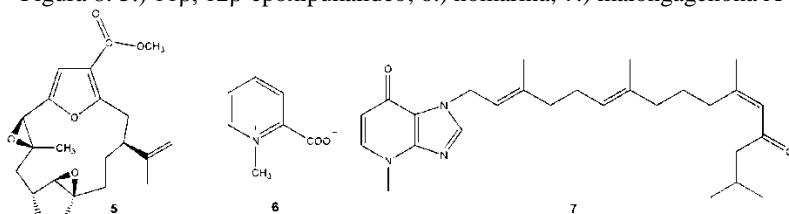
Ao investigar a espécie *Leptogorgia setacea*, coletada no Texas, foi isolado e identificado um derivado do pukalídeo, a substância 11 $\beta$ , 12 $\beta$ -epoxipukalídeo (**5** – Figura 8), bastante semelhante aos furanocembranolídeos descritos para as espécies já mencionadas (KSEBATI et al. 1984).

Das espécies *Leptogorgia virgulata* e *Leptogorgia setacea* foi isolada a homarina (**6** - Figura 8), substância que apresentou potencial atividade

*antifouling* para a espécie de diatomáceas perifíticas *Navicula salinicola* (TARGETT et al. 1983). Esse mesmo composto apresentou também atividade antimicrobiana contra as cepas de *Escherichia coli* BL21, *Vibrio harveyi*, *Micrococcus luteus* e *Bacillus* sp. (SHAPO et al. 2007).

Enquanto que as espécies encontradas no Oceano Pacífico, Atlântico e Caribe apresentaram como constituintes, em sua maioria, diterpenos do tipo cembranolídeos, a espécie *L.gilchristi* encontrada na costa de Moçambique, na África, apresentou diferentes compostos da classe dos alcalóides prenílados como a substância malonganenona A (**7** - Figura 8), que apresentou moderada atividade contra *S.aureus* e contra sete linhagens de células tumorais esofágicas (KEYZERS et al. 2006).

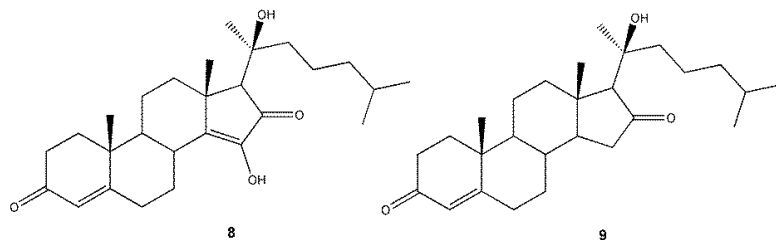
Figura 8: **5.**) 11 $\beta$ , 12 $\beta$ -epoxipukalídeo; **6.**) homarina; **7.**) malongagenona A



Foi ainda isolada de *Leptogorgia piccola*, espécie encontrada no Senegal, uma série de ácidos graxos identificados através de análises de cromatografia gasosa com espectrometria de massas acoplada. Dentre os ácidos graxos identificados estavam um ácido graxo incomum (ácido 7-metil-6-hexadecenoico) e, majoritariamente, o ácido araquidônico. A substância piccolamina e outros derivados também foram identificados e um produto de oxidação da piccolamina apresentou alta inibição de cepas bacterianas e fúngicas testadas em triagem (MIRALLES et al. 1995; ROUSSIS et al. 1991).

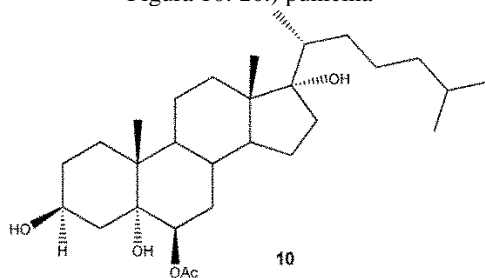
Da espécie *Leptogorgia sarmentosa*, encontrada na região do Mediterrâneo, também foram isolados esteróides polioxigenados (**8** e **9** – Figura 9) (CIMINO et al. 1984; GARRIDO et al. 2000), dentre os quais alguns apresentaram citotoxicidade significativa contra células tumorais de diferentes linhagens (linhagem P-388 de neoplasma linfóide, linhagem A-549 de carcinoma de pulmão humano, linhagem HT-29 de carcinoma de cólon humano; suspensão e linhagem MEL-28 de melanoma humano) (GARRIDO et al. 2000; BOONANANWONG et al. 2008).

Figura 9: Esteróides polioxigenados de *Leptogorgia sarmentosa*.



Dentre as espécies investigadas no Brasil estão duas espécies coletadas no Rio de Janeiro, *Leptogorgia punicea* e *Leptogorgia violacea*, que apresentam constituição química bastante distinta. Enquanto que da espécie *Leptogorgia punicea* foram isolados esteroides mono-oxigenados e um esteroide polioxigenado incomum, denominado punicina (**10** – Figura 10) (EPIFANIO et al. 2000), a espécie *Leptogorgia violacea* é rica em diterpenos do tipo furanocembranolídeos, como a lofotoxina (**1**) (EPIFANIO et al. 1998).

Figura 10: **10.**) punicina



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DO MATERIAL

O material foi coletado em duas coletadas com o apoio do biólogo João L. F. Carraro (doutorando em Ecologia – PPgEco/UFRGS) mergulho autônomo Ilha das Aranhas (27°29'12'' S; 48°21'37'' W), localizadas no litoral de Santa Catarina, em 10-14 m de profundidade (tabela 4). Os organismos coletados foram congelados em freezer, a espécie foi depositada na coleção de Invertebrados do Departamento de Ecologia e Zoologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Tabela 4: Locais e datas de coleta dos invertebrados marinhos.

Espécies	Local de coleta (profundidade)	Mês e ano
Filo Cnidaria (Octocorallia)		
<i>Leptogorgia punicea</i>	Ilha das Aranhas (10-14 m)	Abril 2011
<i>Leptogorgia punicea</i>	Ilha das Aranhas (10-14 m)	Novembro 2011

### 4.2 PROCEDIMENTOS GERAIS

#### 4.2.1 Cromatografia em camada delgada

Para os procedimentos cromatográficos foram utilizados solventes orgânicos de pureza P.A. (para análise) de procedências variadas como Merck®, Nuclear®, Vetec®, água (destilada em laboratório ou Milli-Q). Foram utilizadas as cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 da Merck® F256 e Silicycle®.

Como reveladores das placas foram utilizados os reagentes cromogênicos anisaldeído-sulfúrico após aquecimento e ninhidrina. As placas cromatográficas foram ainda observadas sob luz ultravioleta de 254 e 266 nm.

#### 4.2.2 Cromatografia em coluna

As resinas utilizadas como fase estacionária das colunas cromatográficas foram: sílica gel 60 da marca Merck® com as granulometrias de 0,04-0,063 mm e 0,063-0,2 mm.

#### 4.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para uso nas análises por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) foram utilizados metanol grau HPLC de procedência da MTedia® e água Milli-Q (Millipore®). A coluna utilizada foi coluna preparativa Shim-pack ODS 10 mm, 250 mm x 21,2 mm e membranas (Millipore®) de 0,45 µm para purificação da fase móvel e das amostras.

#### 4.2.4 Análise Instrumental

Para a elucidação estrutural das substâncias isoladas, foram utilizados métodos espectroscópicos como a Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (<sup>1</sup>H) e carbono (<sup>13</sup>C), espectroscopia no Infravermelho e no Ultravioleta além da Espectrometria de Massas.

Os equipamentos utilizados foram:

a) Espectroscopia de RMN: Equipamento Brucker AM 500 (500 e 125 MHz para RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C respectivamente) e Varian AS-400 NMR (400 and 100 MHz para RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C respectivamente).

b) Infravermelho: Equipamento IR Prestige-21 FTIR-8400 Shimadzu

c) Ultravioleta: Espectrômetro Lambda 10 UV/Vis PerkinElmer

d) Massas: Espectrômetro Bruker MicrOTOF-Q II

### 4.3 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS DE *Leptogorgia punicea*

Extratos para triagem

A extração de 17,8 g de material liofilizado de *L. punicea* foi realizada por processo de maceração à temperatura ambiente, utilizando solventes orgânicos (hexano P.A. (3 dias), diclorometano P.A. (3 dias), metanol P.A. (7 dias) e etanol 40° (30 minutos em ultrassom). Uma fração dos extratos metanol e etanol 40° foram submetidos a extração líquido-líquido com acetato de etila (3 x de 50 mL) e posteriormente com n-butanol (3 x de 50 mL). Após filtrar, os extratos foram concentrados sob vácuo e temperatura inferior a 40° C, utilizando-se evaporador rotatório.

#### Extratos para isolamento 1 (EI1)

A extração de 200 g de *L. punicea* congeladas foi realizada em três vezes sucessivas com etanol P.A. por sete dias, o extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório e submetido a extração líquido-líquido com hexano (3 x de 150 mL).

#### Extrato para isolamento 2 (EI2)

A extração de 1,2 Kg de *L. punicea* foi realizada da mesma forma do isolamento 1, em três vezes sucessivas com etanol P.A. por sete dias, o extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório e submetido a extração líquido-líquido com hexano (3 x de 150 mL).

#### Extrato para isolamento 3 (EI3)

A extração de 2,5 Kg de *L. punicea* foi realizada da mesma forma do isolamento 1, em três vezes sucessivas com etanol P.A. por sete dias, o extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório e submetido a extração líquido-líquido com hexano (3 x de 150 mL).

### 4.4 ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS F3 E F4 DE *Leptogorgia punicea*

O isolamento dessas substâncias está apresentado de forma esquemática na figura 8 página 16.

#### Coluna LPI

Em uma coluna de vidro contendo 60 g de gel de sílica de 0,063-0,2 mm de granulometria e utilizando como fase móvel um gradiente de hexano e acetato de etila, a amostra, 700 mg da fração hexano do extrato etanol (EI1), foi aplicada no topo da coluna sob forma de pastilha e dando início a coluna com hexano. Foram coletadas 110 frações e através de análises cromatográficas

foram reunidas em grupos resultando em 8 subfrações, das quais a fração 109-110 foi intitulada F1 e apresentando um rendimento de 27 mg.

#### Coluna LP2

A coluna LP2 foi realizada com a fração F1 da coluna LP1 em uma coluna de vidro pequena (20 cm x 1 cm) e utilizando-se sílica fina (0,04-0,063). A fase móvel utilizada foi clorofórmio: acetato de etila (1:1 v/v). Foram obtidas 25 frações e ao serem analisadas foram reunidas de acordo com a semelhança entre as manchas na cromatografia em camada delgada resultando em uma subfração 18-21 que foi intitulada F2 com 10 mg.

#### Coluna LP3

Isolamento por CLAE preparativa da fração F2 (10 mg) da coluna LP2 YMC-Pack ODS-A, com fase móvel metanol: água (9:1 v/v) de forma isocrática. Foram obtidas 40 frações, das quais puderam ser obtidas de forma pura as substâncias F3 e F4. As frações foram monitoradas quanto a presença de substâncias detectadas através do índice de refração, conforme figura 13, página 19.

### 4.5 ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS F3, F4, F5, F6 E F7 DE *LEPTOGORGIA PUNICEA*

O isolamento dessas substâncias está apresentado de forma esquemática na figura 11 página 18.

#### Coluna LP4

A coluna LP4 foi realizada em funil sinterizado contendo sílica para placa preparativa, na presença de vácuo. A amostra, fração hexano do extrato etanólico (EI3), foi aplicada em forma de pastilha no topo do funil. Como fase móvel, foram utilizados gradientes dos solventes hexano, acetato de etila e metanol, começando com 100% de hexano e aumentando a polaridade gradativamente. Foram obtidas 11 frações dessa coluna.

#### Coluna LP5

A coluna LP5 foi realizada com 500 mg da fração 7 (Fr. 1AcO:1Metanol) da coluna LP4 em uma coluna de vidro (35 cm x 2 cm) com 60 g de gel de sílica de 0,063-0,2 mm de granulometria e utilizando como fase móvel um gradiente de clorofórmio:acetato de etila (1:1 v/v), a amostra. Foram obtidas 85 frações e ao serem analisadas foram reunidas de acordo com a semelhança entre as manchas na cromatografia em camada delgada resultando em uma subfração 63-78 intitulada FP2 com 25 mg.



## Coluna LP7

Isolamento por CLAE preparativa da fração F2 (25 mg) em coluna 6 Phenomenex Synergi 4 C18, com fase móvel metanol: água (9:1 v/v). Foram obtidas 45 frações.

## Coluna LP8, LP9, LP10 e LP11

Isolamento por CLAE preparativa da fração 5, 6, 7 e 8 da coluna LP7, utilizando coluna Phenomenex Synergi 4 C18 e fase móvel acetonitrila:água (8:2 v/v) de forma isocrática. Foram obtidas 20 frações, das quais puderam ser obtidas de forma pura as substâncias F3, F4, F5, F6 e F7. As frações também foram monitoradas quanto a presença de substâncias detectadas através do índice de refração.

**Substância F3: 6 $\beta$ -acetóxi-colestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,11 $\beta$ -triol:** pó branco

IV (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3442, 1714, 1371, 1259, 1163, 1037

ESI MS:  $m/z$  496,3964  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  (100), (calc. para  $\text{C}_{29}\text{H}_{54}\text{NO}_5^+$  496,3997); experimento CID-MS/MS (CE 15 eV, Argônio) em  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$   $m/z$  496,00:  $m/z$  478,3891  $[\text{M}+\text{NH}_4-\text{H}_2\text{O}]^+$  (calc. para  $\text{C}_{29}\text{H}_{52}\text{NO}_4$  478,3891);  $m/z$  461,3619  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$  (calc. para  $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{O}_4$  461,3625) e  $m/z$  443,3518  $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$  (calc. para  $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{O}_3$  443,3520) e  $m/z$  383,3311  $[\text{M}+\text{H}-3\text{H}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$  (calc. para  $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{O}$  383,3308).

RMN: Tabela 4 e 5.

**Substância F4: 6 $\beta$ -acetóxi-colestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,18-triol:** pó branco

IV (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3442, 1714, 1377, 1257, 1244, 1165, 1033

ESI MS:  $m/z$  501,3540  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (100), (calc. para  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{NaO}_5^+$  501,3550); experimento CID-MS/MS (CE 26 eV, Argônio) em  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  501,00:  $m/z$  459,3505  $[\text{M}+\text{Na}-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$  (calc. para  $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{O}_4$  459,3469) e  $m/z$  441,3331  $[\text{M}+\text{Na}-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}]^+$  (calc. para  $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{O}_3$  441,3363).

RMN: Tabela 4 e 5.

**Substância F5: 6 $\beta$ -acetóxi-colest-22E-en-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,11 $\beta$ -triol:** pó branco

ESI MS:  $m/z$  499,3406  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (100), (calc. para  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{NaO}_5^+$  499,3394),  $m/z$  494,3854  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  (calc. para  $\text{C}_{29}\text{H}_{52}\text{NO}_5^+$  494,3840); experimento CID-MS/MS (CE 10 eV, argônio) em  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$   $m/z$  494,00:  $m/z$  476,3735  $[\text{M}+\text{NH}_4-\text{H}_2\text{O}]^+$  (calc. para  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{NO}_4$  476,3734),  $m/z$  459,3463  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$  (calc. para  $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{O}_4$  459,3469) e  $m/z$  381,3142  $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}-3\text{H}_2\text{O}]^+$  (calc. para  $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{O}$  381,3152).

RMN: Tabela 4 e 5.

**Compound 4: 24-nor-6 $\beta$ - acetóxi-colest-22E-en-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,11 $\beta$ -triol:** pó branco

ESI MS:  $m/z$  485,3261  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (100) (calc. para  $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{NaO}_5^+$  485,3237),  $m/z$  480,3690  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  (calc. para  $\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{NO}_5^+$  480,3684); experimento CID-MS/MS (CE 10 eV, Argônio) em  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$   $m/z$  480,00:  $m/z$  462,3546  $[\text{M}+\text{NH}_4-\text{H}_2\text{O}]^+$  (calc. para  $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{NO}_4$  462,3578),  $m/z$  445,3271  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$

(calc. para  $C_{28}H_{45}O_4$  445,3312) e  $m/z$  367,2970  $[M+H-C_2H_2O-3H_2O]^+$  (calc. para  $C_{26}H_{38}O$  367,2995).

RMN: Tabela 4 e 5.

**Compound 5: 6 $\beta$ -acetóxi-colest-22*E*-en-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,18-triol:** pó branco

ESI MS:  $m/z$  499,3394  $[M+Na]^+$  (100) (calc. para  $C_{29}H_{48}NaO_5^+$  499,3394),  $m/z$  494,3844  $[M+NH_4]^+$  (calc. para  $C_{29}H_{52}NO_5^+$  494,3840); experimento CID-MS/MS (CE 10 eV, Argônio) em  $[M+NH_4]^+$   $m/z$  494,00:  $m/z$  476,3715  $[M+NH_4-H_2O]^+$  (calc. para  $C_{29}H_{50}NO_4$  476,3734),  $m/z$  459,3428  $[M+H-H_2O]^+$  (calc. para  $C_{29}H_{47}O_4$  459,3469) e  $m/z$  381,3119  $[M+H-C_2H_2O-3H_2O]^+$  (calc. para  $C_{27}H_{41}O$  381,3152).

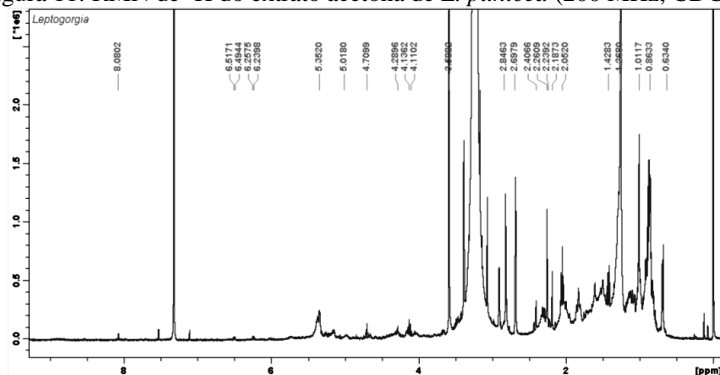
RMN: Tabela 4 e 5.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 RESULTADOS COM O OCTOCORAL *Leptogorgia punicea*

A escolha da espécie *Leptogorgia punicea* foi baseada em três fatores: promissora atividade antimicrobiana e antiprotozoária dos extratos testados, abundância nos locais de coleta e sua constituição química em análise preliminar através de  $^1\text{H}$ -RMN (figura 11).

Figura 11: RMN de  $^1\text{H}$  do extrato acetona de *L. punicea* (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



*Leptogorgia punicea* (Milne Edwards & Haime, 1857) (Figura 12) é um octocoral (Octocorallia, Alcyonacea) de coloração roxo-avermelhado, sésil e colonial. No Brasil, essa espécie é encontrada da costa de Santa Catarina à costa do Maranhão (PÉREZ, 2005).

Figura 12: *Leptogorgia punicea* na fenda da Ilha das Aranhas a 12 m de profundidade, município de Florianópolis.



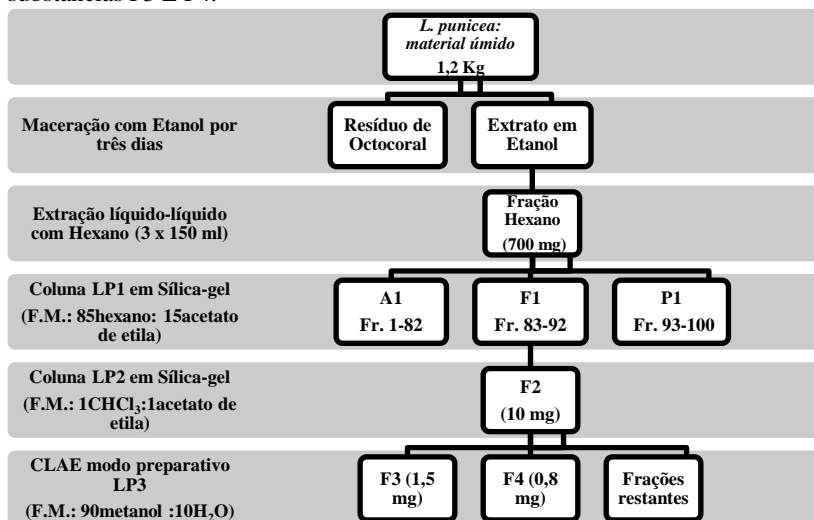
Fonte: Lindner, 2014.

## 5.2 ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS DA FRAÇÃO ATIVA

Os extratos brutos foram fracionados por cromatografia a fim de se proceder a separação do colesterol de outros componentes com características de terpenos ou esteroides. Para isso, foram utilizadas diferentes técnicas, como cromatografia em camada delgada, cromatografia do tipo flash em gel de sílica, em fase reversa e CLAE preparativo em fase reversa (figura 13). As frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) e também por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e de infravermelho (IV), a fim de avaliar a riqueza química dos extratos e a possível presença de componentes promissores.

O material extraído com etanol P.A. foi submetido a partição líquido-líquido com hexano que resultou em uma fração de 700 mg. Esta foi selecionada para o isolamento através de uma coluna em sílica gel (Coluna LP1), utilizando-se como fase móvel um gradiente de hexano sendo adicionado gradativamente porções de acetato de etila. A coluna resultou em 100 frações, dentre elas as frações semelhantes foram reunidas.

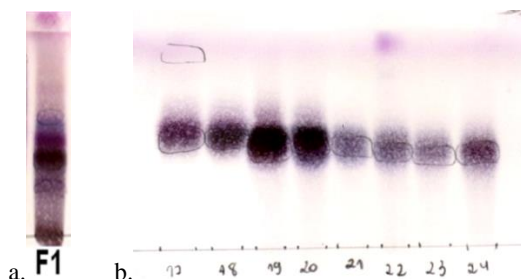
Figura 13: Resumo das metodologias empregadas para o isolamento das substâncias F3 E F4.



Uma fração de polaridade média foi selecionada como promissora por suas características cromatográficas e seguiu-se sua purificação. A fração de 40 mg denominada F1 (figura 9a) foi submetida a outra coluna de sílica gel (coluna LP2) com fase móvel clorofórmio: acetato de etila (50:50 v/v) e dela resultaram

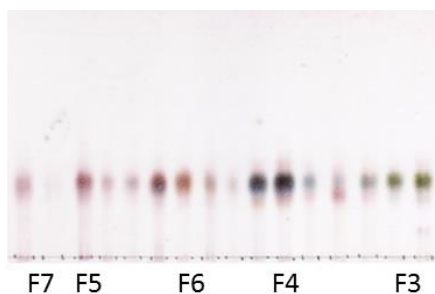
em frações que foram reunidas e que aparentemente estavam puras (figura 14) com apenas uma mancha resultando em uma fração de 10 mg (F2). Essa fração foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz) e constatou-se que se tratava de uma mistura complexa.

Figura 14: a. Cromatografia de camada delgada da fração F1 da coluna LP1. b. Cromatografia de camada delgada das frações da coluna LP2 (Fr.17-24). F.M.: clorofórmio: acetato de etila (50:50 v/v) e reagente de detecção: anisaldeído-sulfúrico.



A fração F2 foi então submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE- LP3) em modo preparativo com coluna YMC-Pack ODS-A (LP3) e fase móvel metanol: água Milli-Q (90:10 v/v), utilizando detectores de ultravioleta (UV100- Thermo Separation - 215 nm) e índice de refração (Thermo separation products Refractor Monitor<sup>®</sup> IR). Foram obtidas 20 frações e destas, duas continham substâncias puras, denominadas F3 e F4 (figura 15).

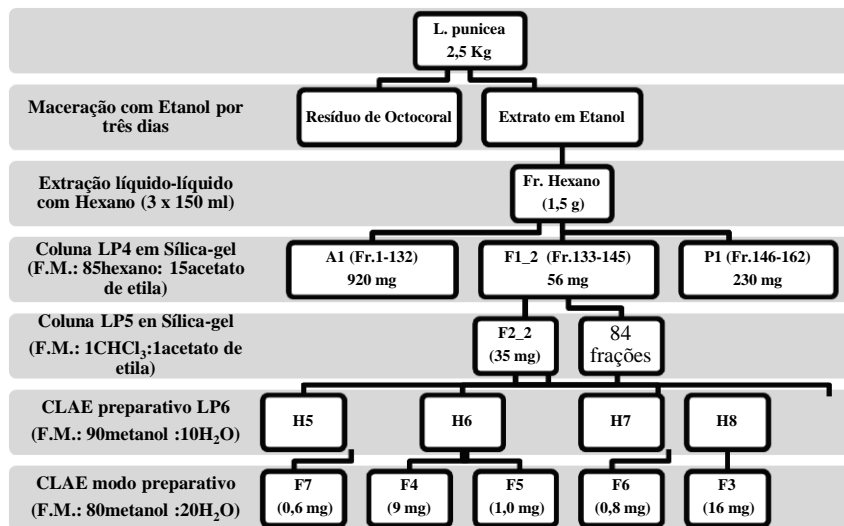
Figura 15: CCD em gel de sílica das substâncias F3 e F4 e demais frações da coluna de CLAE (LP3). (F.M.: clorofórmio: acetato de etila (50:50 v/v) e reagente de detecção: anisaldeído-sulfúrico).



Com o objetivo de isolar as demais substâncias presentes na fração hexano, outras coletas do octocoral foram realizadas. Foi realizada uma coleta

de *Leptogorgia punicea* (2,5 Kg) e esse material foi extraído como descrito anteriormente, conforme o fluxograma apresentado na figura 16.

Figura 16: Resumo das metodologias empregadas para o isolamento das substâncias F3-F7.

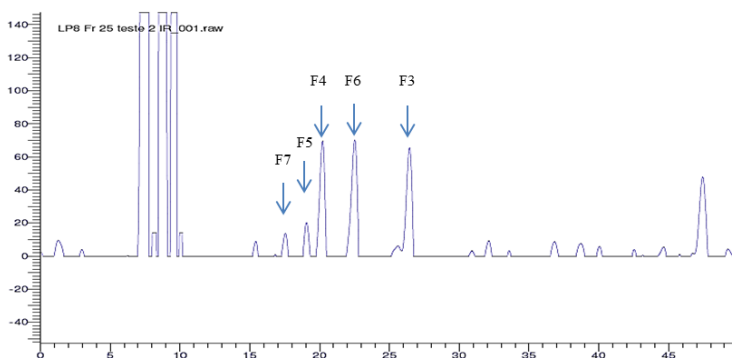


O extrato em etanol seco obtido foi ressuscitado na mistura de solventes: água e metanol (10:90 v/v) e particionado com hexano, resultando na fração hexano de 1,5 g. Considerando os resultados prévios que indicaram atividade no extrato menos polar (extrato hexano), a fração hexano foi processada visando o isolamento de suas substâncias. O fracionamento foi realizado através de cromatografia do tipo “flash” em funil com gel de sílica (Coluna LP4), utilizando-se como fase móvel com hexano e gradiente com proporções crescentes de acetato de etila. Após, proporções crescentes de metanol foram adicionadas ao final. A coluna resultou em 11 frações (1-11) e foram reunidas em três frações de acordo com suas características. Através de comparação por cromatografia de camada delgada, a fração F1\_2 foi selecionada por apresentar mancha semelhante à das substâncias F3 e F4. A fração F1\_2 foi então submetida a uma coluna de sílica gel (coluna LP5), a fase

móvel utilizada foi uma proporção de clorofórmio e acetato de etila (1:1 v/v). Das 85 frações obtidas, a subfração 63-78 (fração F2\_2, 35 mg) foi selecionada para a realização da separação por CLAE (LP6). A coluna da Phenomenex Synergi 4 C18 foi utilizada para a separação das substâncias da fração F2\_2 da coluna LP5 utilizando-se uma fase móvel com proporção de metanol e água (9:1 v/v). Com a coluna CLAE LP6, somente a substância F3 encontrava-se pura na fração H8, com as frações H5, H6 e H7 foram necessárias novas separações pelo CLAE preparativo com a coluna Phenomenex Synergi 4 C18 em sucessivas análises, utilizando a fase móvel acetonitrila: água (8:2 v/v). As separações resultaram no isolamento das substâncias F3, F4, F5, F6 e F7. As substâncias foram analisadas através de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e experimentos de correlações. Adicionalmente, foram obtidos os espectros de massas de alta resolução das substâncias.

A análise em CLAE, utilizando como método de detecção o índice de refração, mostra a complexidade da mistura (Figura 17).

Figura 17: Cromatograma de CLAE da fração F2. (F.M.: metanol: H<sub>2</sub>O milli-q (90:10 v/v) e detecção: índice de refração).



### 5.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

#### 5.3.1 Substância F3

A substância F3 foi obtida na forma de sólido branco (P.F.: 105 °C). Através dos fracionamentos sucessivos visando o seu isolamento, foram obtidos 17,5 mg da substância. A fórmula molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_5$ , foi determinada pelo espectro de massas obtido por espectrometria de alta resolução com ionização

por ESI (modo positivo) e indicou  $m/z$  496,3964 (calc. para  $C_{29}H_{54}NO_5^+$  496,3997) referente à molécula cationizada  $[M+NH_4]^+$ . A fórmula molecular obtida corresponde a presença de cinco graus de insaturação para a molécula.

O espectro de RMN de  $^{13}C$  apresentou 29 sinais de carbonos (Tabela 5) e juntamente com os espectros de RMN de  $^1H$  e atribuições de HSQC/DEPT (Figura 18) esses carbonos foram identificados como quatro carbonos quaternários, dez metilenos, nove metinos e seis metilas. De acordo com dados obtidos pelo espectro de infravermelho (absorções em  $1037\text{ cm}^{-1}$ ,  $1259\text{ cm}^{-1}$  e em  $1714\text{ cm}^{-1}$ ) e pelo espectro de carbono (sinal em  $\delta 171,3$ ), foi determinada a presença de um grupamento éster na estrutura. Considerando que os espectros não apresentaram outras absorções referentes à carbonos  $sp^2$ , o grau de insaturação obtido (cinco) através da fórmula molecular seria referente a um esqueleto tetracíclico (Figura 19) e a um grupamento éster.

Figura 18: Espectro de HSQC/DEPT da substância F3 em  $CDCl_3$  (500/125 MHz).

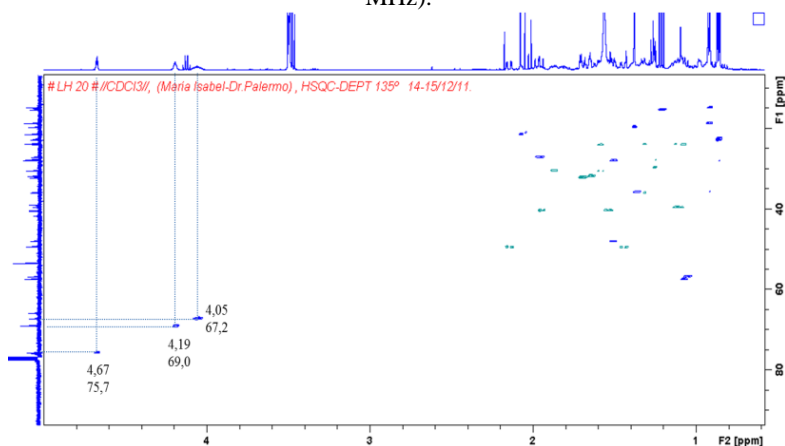


Figura 19: Esqueleto comum dos esteroides: ciclopentanoperidrofenantreno.

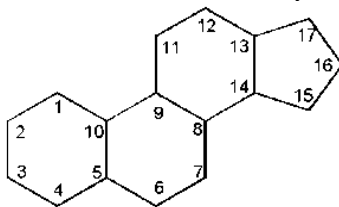




Tabela 5: Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias F3-F7 em  $\text{CDCl}_3$  (125 MHz).

Posição	F3 $^{13}\text{C}$	F4 $^{13}\text{C}$	F5 $^{13}\text{C}$	F6 $^{13}\text{C}$	F7 $^{13}\text{C}$
1	31,8	32,0	32,3	32,2	32,4
2	30,5	30,7	30,9	30,9	31,0
3	67,2	67,3	67,6	67,6	67,6
4	40,4	40,5	40,8	40,8	40,9
5	75,9	75,3	76,3	76,3	75,7
6	75,7	75,9	76,0	76,1	76,3
7	32,2	31,6	32,6	32,6	32,0
8	27,1	30,9	27,5	27,6	31,3
9	48,0	45,5	48,5	48,5	45,9
10	39,0	38,5	39,4	39,4	38,9
11	69,0	21,3	68,3	69,4	21,5
12	49,4	34,7	49,6	49,6	34,5
13	41,7	40,5	42,0	42,0	47,1
14	57,4	55,4	57,9	57,9	55,8
15	23,8	23,9	28,6	28,4	24,3
16	24,1	28,1	24,4	24,4	27,6
17	56,8	56,4	56,9	57,0	56,6
18	14,8	61,2	15,4	15,4	60,7
19	19,6	16,5	20,0	20,0	16,9
20	35,8	36,3	40,5	40,3	40,3
21	18,7	19,3	21,3	21,2	22,7
22	36,0	36,3	138,1	133,7	137,8
23	27,8	23,6	126,0	135,5	127,8
24	39,5	39,5	42,3	-	42,3
25	28,0	28,0	28,9	31,3	28,9
26	22,5	22,6	22,7	23,2	22,7
27	22,8	22,8	22,7	23,2	22,7
6-OAc	170,3	171,3	170,7	170,7	170,5
	21,5	21,4	21,9	21,8	21,8

Esses dados em conjunto com sinais observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de duas metilas terciárias em  $\delta$  0,91 (s) e  $\delta$  1,38 (s), além de três metilas secundárias  $\delta$  0,86 (d),  $\delta$  0,87 (d) e  $\delta$  0,92 (d) (Figura 20; Tabela 6) sugerem a presença de uma estrutura esteroidal do tipo colestano (Figura 21).

Tabela 6: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias F3-F7 em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

Position	F3	F4	F5	F6	F7
1	1,65 ( $\text{m}^a$ )	1,45 ( $\text{m}^a$ )	1,65 ( $\text{m}^a$ )	1,65 ( $\text{m}^a$ )	1,45 ( $\text{m}^a$ )
2 $\alpha$	1,87 ( $\text{m}^a$ )	1,86 ( $\text{m}^a$ )	1,87 ( $\text{m}^a$ )	1,87 ( $\text{m}^a$ )	1,86 ( $\text{m}^a$ )
2 $\beta$	1,58 ( $\text{m}^a$ )	1,52 ( $\text{m}^a$ )	1,57 ( $\text{m}^a$ )	1,58 ( $\text{m}^a$ )	1,54 ( $\text{m}^a$ )
3	4,05 ( $\text{m}^a$ )	4,09 ( $\text{m}^a$ )	4,05 ( $\text{m}^a$ )	4,06 ( $\text{m}^a$ )	4,08 ( $\text{m}^a$ )
4 $\alpha$	1,54 ( $\text{m}^a$ )	1,58 ( $\text{m}^a$ )	1,54( $\text{m}^a$ )	1,56( $\text{m}^a$ )	1,57 ( $\text{m}^a$ )
4 $\beta$	1,95 ( $\text{m}^a$ )	1,85 ( $\text{m}^a$ )	1,95 ( $\text{m}^a$ )	1,96 ( $\text{m}^a$ )	1,85 ( $\text{m}^a$ )
6	4,67 (dd, 3,2)	4,70 (dd, 3,0)	4,66 (dd, 3,0)	4,66 (dd, 3,1)	4,70 (dd, 2,8)
7	1,70 ( $\text{m}^a$ )	1,61 ( $\text{m}^a$ )	1,70 ( $\text{m}^a$ )	1,70 ( $\text{m}^a$ )	1,59 ( $\text{m}^a$ )
8	1,96 ( $\text{m}^a$ )	1,68 ( $\text{m}^a$ )	1,95 ( $\text{m}^a$ )	1,96 ( $\text{m}^a$ )	1,67 ( $\text{m}^a$ )
9	1,51 ( $\text{m}^a$ )	1,38 ( $\text{m}^a$ )	1,50 ( $\text{m}^a$ )	1,51 ( $\text{m}^a$ )	1,38 ( $\text{m}^a$ )
11 $\alpha$	4,19 (dd, 6,5; 3,2)	1,48 ( $\text{m}^a$ )	4,19 (dd, 6,5; 3,2)	4,19 (dd, 6,3; 3,3)	1,48 ( $\text{m}^a$ )
11 $\beta$	-	1,31 ( $\text{m}^a$ )	-	-	1,30 ( $\text{m}^a$ )
12 $\alpha$	1,45 ( $\text{m}^a$ )	1,04 ( $\text{m}^a$ )	1,44 ( $\text{m}^a$ )	1,46 ( $\text{m}^a$ )	1,00 ( $\text{m}^a$ )
12 $\beta$	2,15 (dd, 14,0; 2,7)	2,46 (td, 12,7; 3,0)	2,11 (dd, 14,0; 2,7)	2,11 (dd, 14,2; 2,9)	2,42 (td, 12,7; 3,0)
14	1,08 ( $\text{m}^a$ )	1,24 ( $\text{m}^a$ )	1,08 ( $\text{m}^a$ )	1,07 ( $\text{m}^a$ )	1,21 ( $\text{m}^a$ )
15 $\alpha$	1,32 ( $\text{m}^a$ )	1,57 ( $\text{m}^a$ )	1,66 ( $\text{m}^a$ )	1,64 ( $\text{m}^a$ )	1,55 ( $\text{m}^a$ )
15 $\beta$	1,10 ( $\text{m}^a$ )	1,01 ( $\text{m}^a$ )	1,26 ( $\text{m}^a$ )	1,25 ( $\text{m}^a$ )	0,95 ( $\text{m}^a$ )
16 $\alpha$	1,59 ( $\text{m}^a$ )	1,89 ( $\text{m}^a$ )	1,55( $\text{m}^a$ )	1,57 ( $\text{m}^a$ )	1,75 ( $\text{m}^a$ )
16 $\beta$	1,08 ( $\text{m}^a$ )	1,41 ( $\text{m}^a$ )	1,08 ( $\text{m}^a$ )	1,08 ( $\text{m}^a$ )	1,42 ( $\text{m}^a$ )
17	1,06 ( $\text{m}^a$ )	1,20 ( $\text{m}^a$ )	1,10 ( $\text{m}^a$ )	1,08 ( $\text{m}^a$ )	1,28 ( $\text{m}^a$ )
18 $a$	0,91 (s)	3,73 (dd, 11,4; 4,7)	0,93 (s)	0,92 (s)	3,62 (d, 11,7)
18 $b$		3,61 (dd, 11,4; 4,7)			3,55 (d, 11,7)
19	1,38 (s)	1,15 (s)	1,38 (s)	1,38 (s)	1,15 (s)
20	1,36 ( $\text{m}^a$ )	1,57 ( $\text{m}^a$ )	2,01 ( $\text{m}^a$ )	1,97 ( $\text{m}^a$ )	2,29 (dd, 15,3; 8,4)
21	0,92 (d, 6,6)	1,03 (d, 6,6)	1,01 (d, 6,5)	1,00 (d, 6,6)	1,09 (d, 6,6)
22	1,38 ( $\text{m}^a$ ) 1,06 ( $\text{m}^a$ )	1,37 ( $\text{m}^a$ ) 1,04 ( $\text{m}^a$ )	5,16 (dd, 15,0; 9,0)	5,13 (dd, 15,0; 8,4)	5,33 (dd, 15,0; 8,5)
23	1,81 ( $\text{m}^a$ ) 1,25 ( $\text{m}^a$ )	1,18 ( $\text{m}^a$ ) 1,33 ( $\text{m}^a$ )	5,26 (dd, 15,0; 7,0)	5,26 (dd, 15,0; 6,6)	5,37 (dd, 15,0; 6,5)
24	1,11 ( $\text{m}^a$ )	1,13 (ma)	1,82 ( $\text{m}^a$ )	-	1,85 ( $\text{m}^a$ )
25	1,51 ( $\text{m}^a$ )	1,51 ( $\text{m}^a$ )	1,56 ( $\text{m}^a$ )	2,18 ( $\text{m}^a$ )	1,58 ( $\text{m}^a$ )
26	0,86 (d, 6,6)	0,86 (d, 6,6)	0,86 (d, 6,7)	0,94 (d, 6,6)	0,87 (d, 6,7)
27	0,87 (d, 6,6)	0,87 (d, 6,6)	0,86(d, 6,7)	0,94 (d, 6,6)	0,87 (d, 6,7)
6-OAc	2,07 (s)	2,06 (s)	2,07(s)	2,07 (s)	2,06 (s)

<sup>a</sup> Sinais sobrepostos

Figura 20: Ampliação do RMN de  $^1\text{H}$  com sinais das metilas em  $\delta$  0,86 (d),  $\delta$  0,87 (d),  $\delta$  0,92 (d),  $\delta$  0,91 (s) e 1,38.

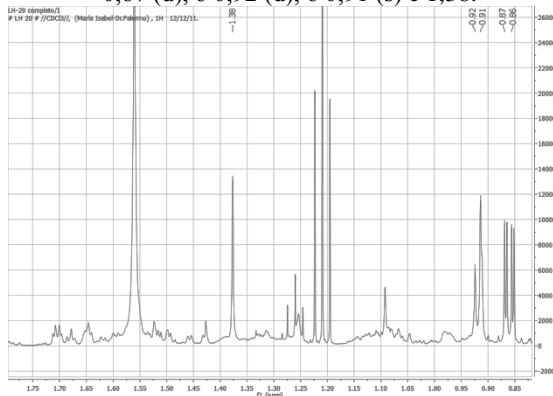
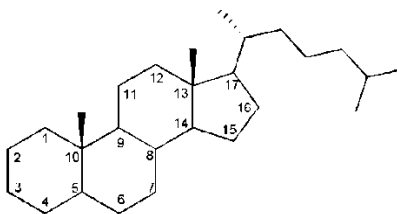
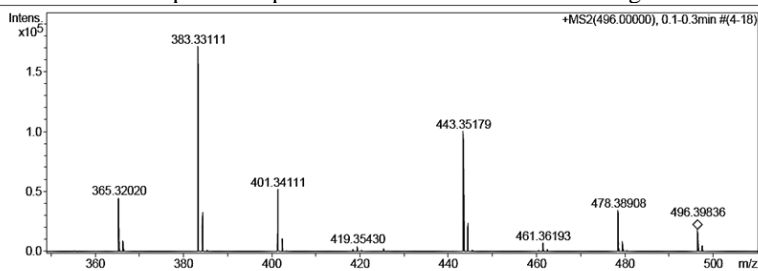


Figura 21: Estrutura química do colestano



O experimento de MS2 realizado para a molécula cationizada  $m/z$  496  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  (Figura 22) gerou fragmentos em  $m/z$  478,3891  $[\text{M}+\text{NH}_4-\text{H}_2\text{O}]^+$ ;  $m/z$  461,3619  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $m/z$  443,3518  $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$  e  $m/z$  383,3311  $[\text{M}+\text{H}-3\text{H}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$  que podem ser explicados por eliminação sucessiva de moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ , o que sugere a presença de um composto polioxigenado.

Figura 22: Espectro de massas MS2 por ESI da substância F3 e fórmulas moleculares possíveis para a massa selecionada e seus fragmentos.

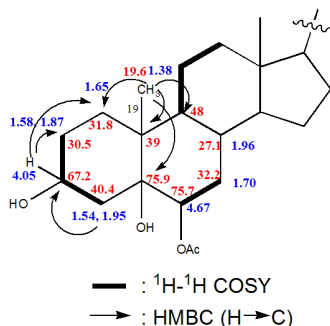


Em concordância com os dados obtidos pela espectrometria de massas, o espectro de infravermelho também apresentou características referentes a grupamentos hidroxila, com absorções para ligações O-H ( $3442\text{ cm}^{-1}$ ) e C-O ( $1163\text{ cm}^{-1}$ ). Através dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  foi possível confirmar a presença de uma hidroxila terciária ligada ao carbono em  $\delta 75,9$  (C) e também duas hidroxilas secundárias relacionadas aos sinais carbinólicos em  $\delta_{\text{C}} 69,0$  (CH)/  $\delta 4,19$  e  $\delta 67,2$  (CH)/  $\delta 4,05$  (Figura 23).

As correlações observadas para o hidrogênio em  $\delta 4,05$  no espectro de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) com hidrogênios vicinais da posição 2 ( $\delta 1,87$  e  $\delta 1,58$ ) e o hidrogênio da posição 4 ( $\delta 1,95$  e  $\delta 1,54$ ) e suas constantes de acoplamento de 16 e 11 Hz caracteriza o hidrogênio da posição 3 ( $\delta 4,05$ ) como axial, atribuindo uma configuração  $\beta$  a hidroxila dessa posição (KASAL et al., 2010). Com base nas correlações de HMBC da metila em  $\delta 1,38$ /Me-19 com os metilenos do carbono em  $\delta 31,8$ /C-1 e outros três carbonos (C-5, C-9 e C-10), determinou-se o anel A do esqueleto colestano (Figura 23). Uma hidroxila foi posicionada no carbono 5 em  $\delta 75,9$ , tendo em vista que esse carbono apresenta correlação de HMBC pelos hidrogênios posicionados em 6 e 19.

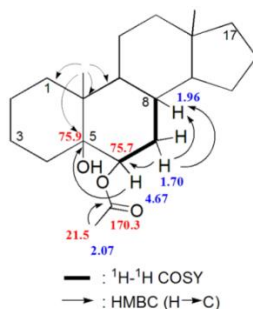
Considerando o fato de uma das posições da substância estar acetilada, o hidrogênio mais desblindado em  $\delta 4,67$  (dd,  $J$  2,8; 3,0 Hz) foi atribuído para o carbono ligado a acetila em  $\delta 75,7$  (CH). O carbono  $\delta 75,7$  foi atribuído ao carbono seis do esteroide devido às correlações de HMBC entre o hidrogênio em  $\delta 4,67$  e os carbonos  $\delta 75,9$ /C-5 e  $\delta 27,1$ /C-8.

Figura 23: Principais correlações de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY e HMBC do anel a da substância F3.



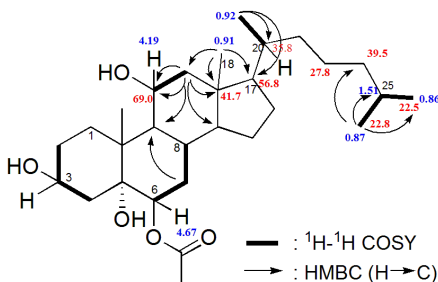
Da mesma forma, o espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY determinou correlações entre o hidrogênio atribuído a posição 7 em  $\delta 1,70$  e os hidrogênios em  $\delta 4,67$ /H-6 e  $\delta 1,96$ /H-8, confirmando parte do anel B (Figura 24). As constantes de acoplamento do sinal do hidrogênio da posição seis ( $J = 2,8; 3,0$  Hz) indicam ainda que está em posição equatorial, estabelecendo uma configuração  $\beta$  para o grupo acetato dessa posição.

Figura24: Principais correlações de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY e HMBC do anel B da substância F3.



A terceira hidroxila foi localizada no carbono 11 devido as correlações observadas entre o metino em  $\delta$  4,19 e os hidrogênios e carbonos das posições 9 e 12 (Figura 25). A configuração  $\beta$  da hidroxila ligada ao carbono da posição 11 foi comprovada pela constante de acoplamento do hidrogênio equatorial em  $\delta$  4,19 (dd,  $J$  6,3; 3,3) (KASAL et al., 2010, YOSHIKAWA et al., 2000).

Figura 25: Principais correlações de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY e HMBC do anel C e cadeia lateral da substância F3.



A elucidação da cadeia lateral da estrutura foi realizada através das correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY entre os hidrogênios  $\delta$  0,86/H-26 e  $\delta$  1,51/H-25. O hidrogênio em 0,86 é característico da metila terminal da cadeia lateral dos colestanos. O outro hidrogênio de metila terminal em  $\delta$  0,87/H-27, apresenta as mesmas correlações que a metila da posição 26. Além dessas correlações, por HMBC foi possível observar correlações entre o hidrogênio em  $\delta$  0,86/H-26 e os carbonos em  $\delta$  22,8/C-27,  $\delta$  28,1/C-25 e  $\delta$  39,5/C-24. O COSY apresentou ainda, correlações entre a metila em  $\delta$  0,92, característica de posição 21, com um metino em  $\delta$  1,36, sugerindo que este estaria na posição 20. Correlações de HMBC da metila em 21 com os carbonos em  $\delta$  35,8/C-20 e em  $\delta$  56,8/C-17 definiu a ligação da cadeia lateral com o restante da molécula.

A estereoquímica relativa da estrutura pode ser estabelecida pela análise das constantes de acoplamento e comparação de dados de literatura. Especificadamente, o hidrogênio em C-3 apresenta desdobramentos múltiplos, devido aos acoplamentos com H-2 $\alpha$ , H-2 $\beta$ , H-4 $\alpha$  e H-4 $\beta$ . Conforme a literatura (YOSHIKAWA et al., 2000), quando o hidrogênio em  $\alpha$  do C-3 (axial) está acoplando com os hidrogênios axiais H-2 e H-4 ocorre um desdobramento em multipletto estendido (40 Hz de distância entre o início e o fim do sinal -  $W_{1/2} = 19,6$ ), enquanto que quando o hidrogênio está em  $\beta$  (equatorial em colestanos), o sinal seria um quinteto com 28 Hz entre o início e o final do sinal. Isso indicaria que a substância isolada F3, teria a hidroxila da posição 3 em  $\beta$ , já que o sinal do espectro apresentou uma distância de 44 Hz entre o início e o final do sinal em um multipletto (Figura 26), os sinais resultantes foram comparados com dados da literatura para confirmação (figura 27).

Figura 29: Região do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância F4 ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) que representa os sinais dos H-3, H-6 e H-11.

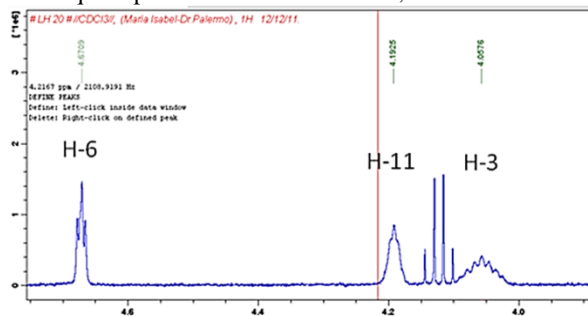
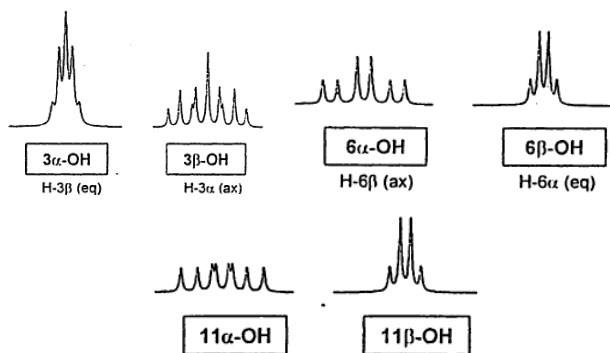


Figura 27: Padrão de desdobramento para a hidroxila em 3, 6 e 11  $\alpha$  ou  $\beta$  descrito na literatura (KASAL ET AL., 2010).



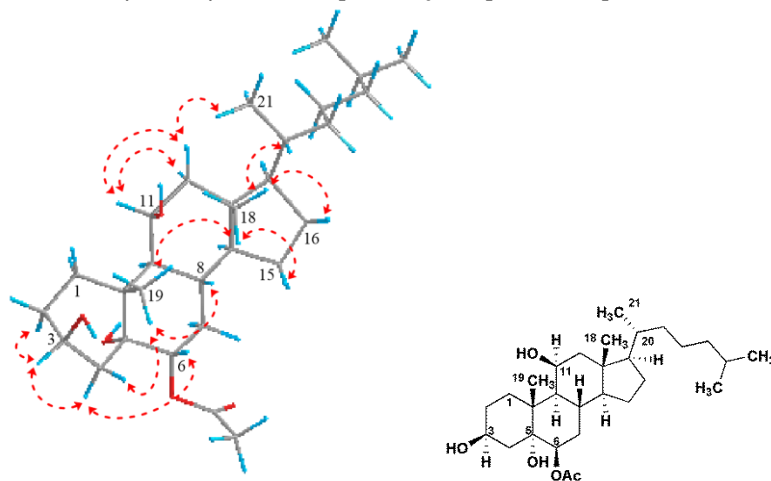
Fonte: Kasal et al. (2010).

Em relação à posição 6, foi observada correlação NOESY entre a metila do grupo acetato com a metila em C-19, indicando que sua posição em  $\beta$ , portanto com o hidrogênio em  $\alpha$  (equatorial), originando neste um desdobramento em tripleto (distância de 13,0 Hz) (figura 28) causada pelo acoplamento com o H-7 ( $J$  2,4 Hz) (KASAL et al. 2010).

A configuração  $\beta$  da hidroxila ligada ao carbono da posição 11 foi caracterizada pela constante de acoplamento pequena do hidrogênio equatorial em  $\delta$  4.19 (dd,  $J$  6,3; 3,3) em relação aos hidrogênios da posição 12 e 9 (KASAL et al., 2010, YOSHIKAWA et al., 2000).

A análise das constantes de acoplamentos demonstra que para o H-6 e H-11 as constantes pequenas decorrem da presença do hidrogênio equatorial enquanto que para o H-3, a grande medida da metade de distância do pico ( $m$ ,  $W_{1/2} = 19,6$ ) caracteriza o acoplamento do hidrogênio axial nessa posição com os hidrogênios axiais nas posições H-2 $\beta$  e H-4 $\beta$ . Para confirmação da configuração relativa o espectro de NOESY (H-H) indicou as correlações entre 3 $\alpha$ /2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ /4 $\alpha$ , 11 $\alpha$ /1, 11 $\alpha$ /4 $\alpha$ , 11 $\alpha$ /12 $\alpha$ , 11 $\alpha$ /12 $\beta$ , 6 $\alpha$ /7, 6 $\alpha$ /4 $\alpha$ , 18/26, 18/16 $\beta$ , 18/15 $\beta$ , 18/19, 18/20, 18/CH<sub>3</sub>-COO, 19/26, 19/1, 19/4 $\beta$ , 19/8 $\beta$ , 19/6-AcO, 21/CH<sub>3</sub>-COO, 21/12 $\beta$  (Figura 22). Essas características definem a substância isolada F3 como 6 $\beta$ -acetóxi- colestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ ,11 $\beta$ -triol, e proposto o nome de punicinol A.

Figura 28: Correlações chaves de NOE da substância F3 - 6 $\beta$ -acetóxi- colestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ ,11 $\beta$ -triol em representação espacial e no plano.

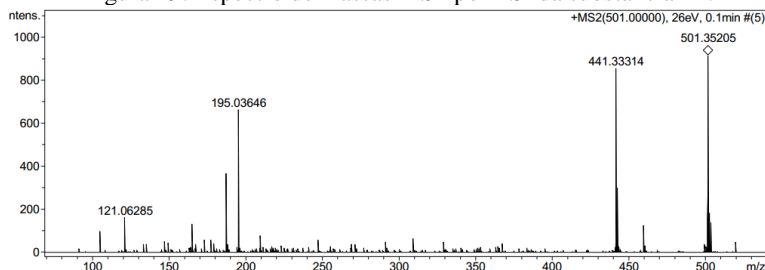


## 5.3.2 Substância F4

A substância F4 foi isolada como um pó branco (P.F.: 110 °C). Através da espectrometria de massas de alta resolução com ionização por electrospray (ESI) foi obtida sua fórmula molecular  $C_{29}H_{50}O_5$ , indicada pela molécula cationizada  $[M+Na]^+$  em  $m/z$  501,3540 (calc. para  $C_{29}H_{50}NaO_5^+$  501,3550). Essa fórmula molecular indica cinco insaturações. Os espectros de RMN de  $^{13}C$  e  $^1H$  para a substância F4 tornou-se bastante semelhante aos espectros da substância F3, e as fórmulas moleculares são as mesmas. Diferentemente de F3, para essa substância os experimentos de HSQC/Dept mostraram apenas quatro metilas, além da metila da acetila.

O MS2 obtido através do experimento de CID (Figura 29) realizado para o íon pseudomolecular  $m/z$  501,00  $[M+Na]^+$  gerou fragmentos em  $m/z$  459,3505  $[M+H-C_2H_2O]^+$  (calc. para  $C_{29}H_{47}O_4$  459,3469) and  $m/z$  441,3331  $[M+H-H_2O]^+$  (calc. para  $C_{29}H_{45}O_3$  441.3363), esses fragmentos podem ser explicados pela eliminação de moléculas de  $H_2O$ , o que também sugere a presença de um composto hidroxilado.

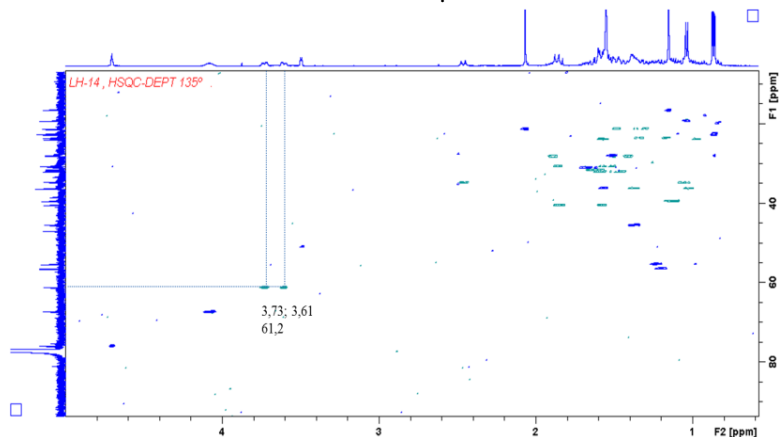
Figura 29: Espectro de massas MS2 por ESI da substância F4.



A diferença entre as substâncias F4 e F3 está principalmente na presença de um grupamento hidroxila em posição diferente, ao invés da posição 11, na substância F4, essa hidroxila foi atribuída à posição 18. Através dos deslocamentos dos sinais nos espectros de  $^1H$  em  $\delta$  3,73 (d,  $J$  11,7, H-18) e  $\delta$  3,61 (d,  $J$  11,7; H-18) assinalados para o mesmo carbono em  $\delta$  61,2 pelo HSQC foi verificada a presença de um metileno ligado a uma hidroxila (Figura 30) e pelas correlações COSY e HMBC e ausência de sinal de metila entre  $\delta$  0,7-0,9 para o C18, foi confirmada a presença do metileno hidroxilado nesta posição.

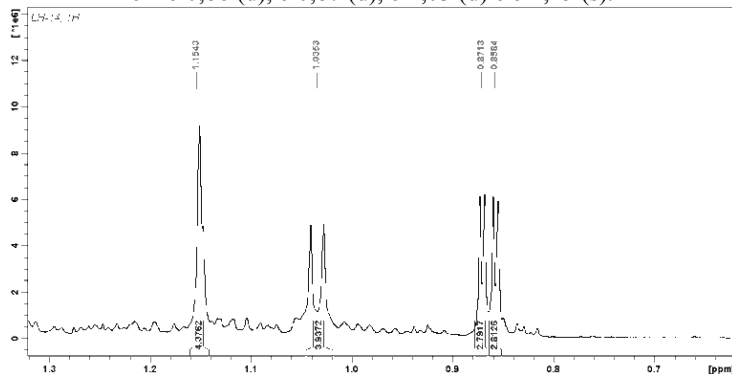
Figura 30: Espectro de HSQC/DEPT ( $CDCl_3$ ; 500/125 MHz) da substância F4 indicando correlações entre os hidrogênios  $\delta$  3,73 e  $\delta$  3,61 com o carbono em  $\delta$  61,2.





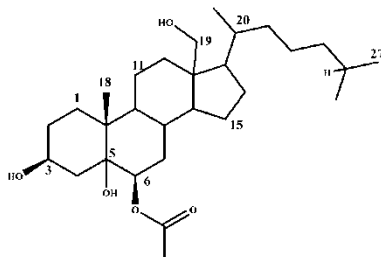
Através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram observadas apenas quatro metilas em  $\delta$  0,86 (d),  $\delta$  0,87 (d),  $\delta$  1,03 (d), e  $\delta$  1,15 (s) (Figura 31), confirmando a ausência de uma das metilas presentes na substância F3.

Figura 31: Ampliação do RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) com sinais das metilas em  $\delta$  0,86 (d),  $\delta$  0,87 (d),  $\delta$  1,03 (d) e  $\delta$  1,15 (s).



Além das metilas encontradas nessa região do espectro, está a metila em  $\delta$  2,06 com correlações de HMBC para  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  171,3 que determina a presença da acetila também na posição 6, mesma encontrada na substância F3. A nova substância F4 foi então definida como 6 $\beta$ -acetóxi-colestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,18-triol (Figura 32) e denominada punicinol B.

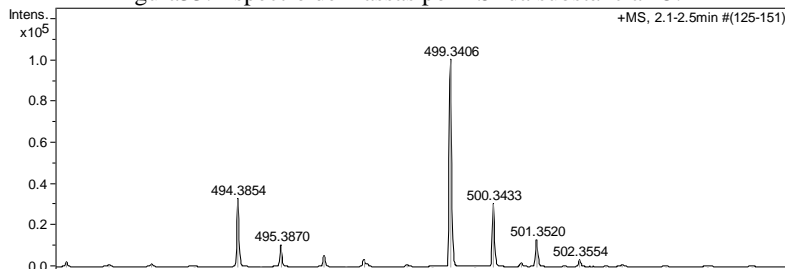
Figura 32: Estrutura da substância F4



### 5.3.3 Substância F5

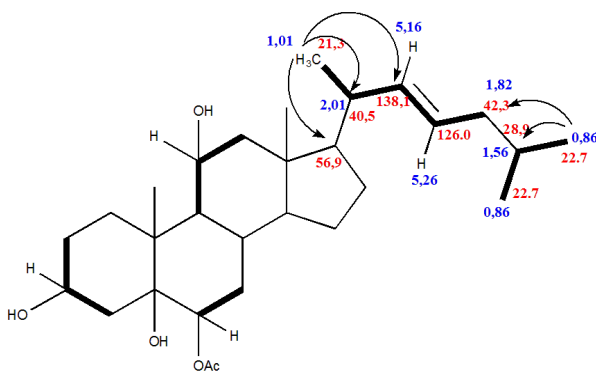
A substância F5 foi isolada como um sólido branco (1,0 mg) através do fracionamento realizado com maior quantidade do octocoral (Figura 16). A fórmula molecular  $C_{29}H_{48}O_5$  obtida através do espectro de massas de alta resolução com ionização por *electronspray*, indicou para a molécula cationizada  $[M+NH_4]^+$   $m/z$  494,3854 (calc. para  $C_{29}H_{52}NO_5^+$  494,3840) (Figura 33). A fórmula molecular indica o valor de seis para o grau de insaturação. Os espectros de RMN também apresentaram bastante semelhança com a substância F3, apresentando sinais equivalentes para os anéis A, B, C e D (Tabelas 5 e 6).

Figura33: Espectro de massas por ESI da substância F5.



Através dos espectros de RMN de  $^{13}C$  e  $^1H$  e HSQC/DEPT foi estabelecida a presença de quatro carbonos quaternários, oito metilenos, 11 metinos e seis metilas. A presença de sinais referentes a uma dupla ligação nos espectros caracteriza a principal diferença, apresentando sinais de dois hidrogênios olefínicos em  $\delta$  5,16 (m) e  $\delta$  5,26 (m) ligados ao C-22 ( $\delta$  138,1) e C-23 ( $\delta$  126,0), respectivamente. A constante de acoplamento vicinal entre os hidrogênios 22 e 23 de 15,0 Hz sugerem a configuração *E* para a dupla ligação. Através das correlações de HMBC e COSY observadas na figura 34, a dupla ligação foi estabelecida na cadeia lateral da substância F5. Por consequência dos dados apresentados, a substância F5 foi definida como 6 $\beta$ -acetóxi-colest-22-en-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,11 $\beta$ -triol, denominada punicinol C.

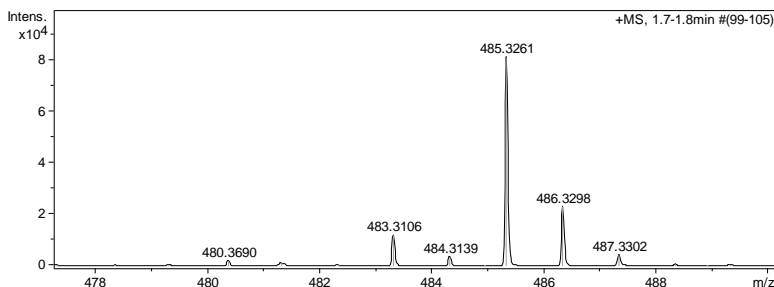
Figura 34: Principais correlações de  $^1H$ - $^1H$  COSY e HMBC da cadeia lateral da substância F5.



### 5.3.4 Substância F6

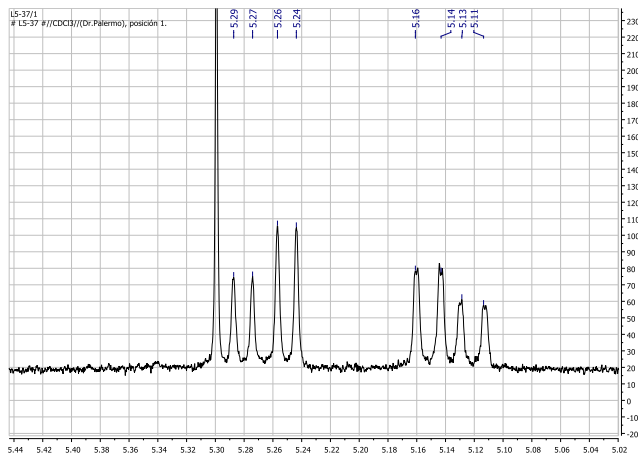
A substância F6 apresenta a forma de sólido branco e foi isolado na quantidade de 0,8 mg através de fracionamento descrito no item 3.2.1. A fórmula molecular  $C_{28}H_{46}O_5$  obtida através da presença da molécula cationizada  $[M+NH_4]^+$  em  $m/z$  480,3690 (calc. para  $C_{28}H_{50}NO_5^+$  480,3684) (Figura 35) sugere a presença de seis insaturações.

Figura 35: Espectro de massas por ESI da substância F6.



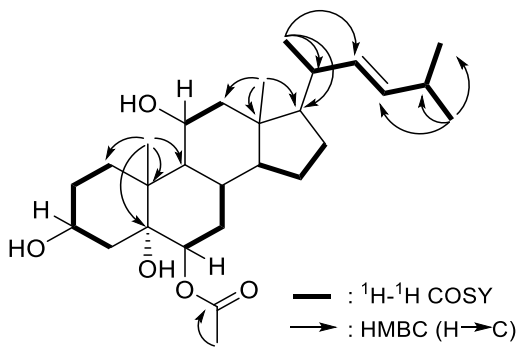
Diferindo das substâncias F3-F5, a substância F6 apresenta 28 carbonos, um a menos dos demais. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H são observados sinais de dupla ligação em  $\delta$  5,13 (dd,  $J = 15,0; 9,0$  Hz) e  $\delta$  5,26 (dd,  $J = 15,0; 7,0$  Hz) (figura 36) com desdobramentos e constantes de acoplamento referentes à configuração *E*.

Figura 36: Ampliação do RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 500 MHz) com sinais dos hidrogênios da olefina em  $\delta$  5,13 e  $\delta$  5,26 da substância F6.



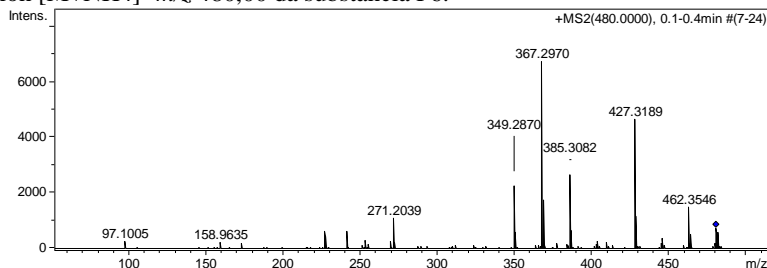
Ao comparar a substância F6 com a substância F5, observa-se a ausência de um carbono metilênico, com um encurtamento da cadeia lateral na posição 24. A confirmação da cadeia lateral foi obtida através das análises das correlações de HMBC e COSY (Figura 37). A configuração *E* da dupla ligação foi definida através da constante de acoplamento vicinal de 15,0 Hz entre os H-22 e H-23. Portanto, a substância F6, foi definida como 24-nor-6 $\beta$ -acetóxicolest-22-en-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,11 $\beta$ -triol e denominado punicolin D.

Figura 37: Estrutura da substância F6 com correlações de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY e HMBC.



Através de experimento de  $\text{MS}^2$  (CE 10 eV, Argon) para o íon  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$   $m/z$  480,00:  $m/z$  (Figura 38) 462,3546  $[\text{M}+\text{NH}_4-\text{H}_2\text{O}]^+$  (calc. para  $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{NO}_4$  462,3578),  $m/z$  445,3271  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$  (calc. para  $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{O}_4$  445,3312) e  $m/z$  367,2970  $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_8\text{O}_4]^+$  (calc. para  $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}$  367,2995), definiu-se o mesmo perfil de fragmentação dos demais compostos, com a perda de  $\text{H}_2\text{O}$  e da acetila.

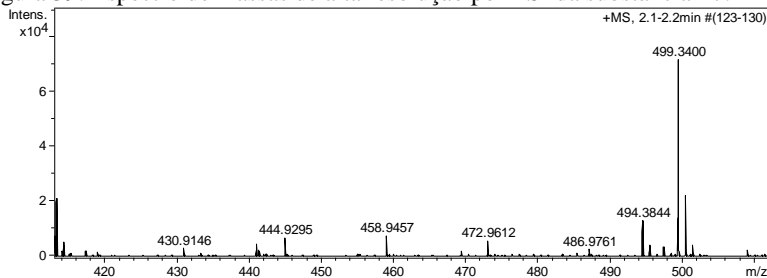
Figura 310: Espectro de experimento de MS2 (CE 10 EV, argônio) por ESI para o íon  $[M+NH_4]^+$   $m/z$  480,00 da substância F6.



### 5.3.5 Substância F7

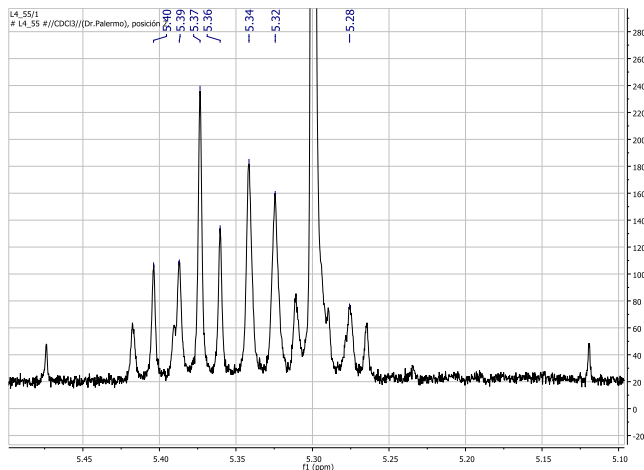
A substância F7 (0,6 mg) foi isolada como um sólido branco através de fracionamento descrito na figura 11. O espectro de massas de alta resolução com ionização por electrospray (ESI) determinou o íon pseudomolecular  $[M+NH_4]^+$  em  $m/z$  494,3844 (Figura 39).

Figura 39: Espectro de massas de alta resolução por ESI da substância F7.



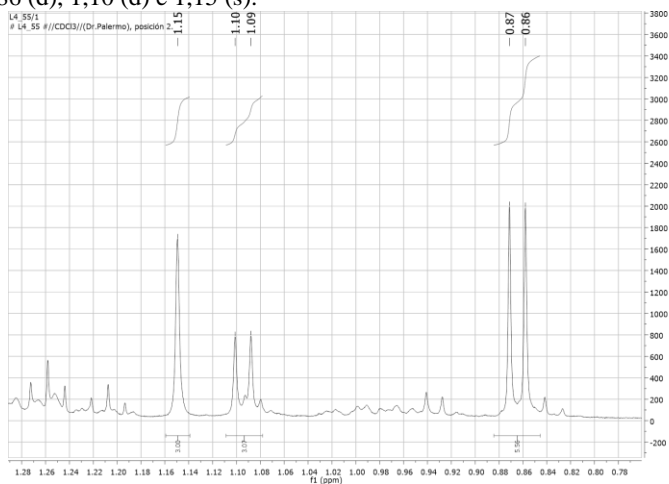
Os espectros de massas e de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$  sugerem a presença de 29 carbonos e apresentaram grande semelhança com os espectros da substância F4, com hidroxilas definidas para as posições C-3, C-5, C-6 e C-18. Entretanto, apresentou como diferença também a dupla ligação na cadeia lateral como na estrutura da substância F5, com configuração *E* ( $J$  15,0 Hz). Os hidrogênios olefínicos estão dispostos em  $\delta$  5,33 (dd,  $J$  15,0; 8,5) e  $\delta$  5,37 (dd,  $J$  15,0; 6,5) e através de simulações de multiplicidade foram definidos como dois duplo-dupletos (Figura 40) ligados aos carbonos C-22 e C-23 respectivamente.

Figura 40: Ampliação de espectro de RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ ; 500 MHz) na região da olefina da substância F7.



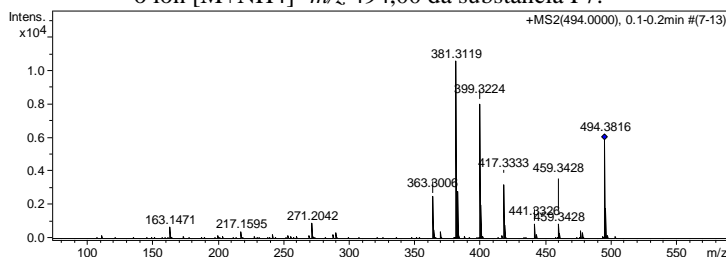
Os sinais das metilas também se diferenciam no espectro de  $^1\text{H}$  em comparação às substâncias F3 e F5, aparecendo em  $\delta$  0,86 (d, duas metilas sobrepostas),  $\delta$  1,10 (d) e  $\delta$  1,15 (s) (Figura 41), destacando-se a ausência da metila em  $\delta$  0,92 (ausência de metila na posição 18).

Figura 11: Ampliação do RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) com sinais das metilas em 0,86 (d), 1,10 (d) e 1,15 (s).



Também foi realizado o experimento  $\text{MS}^2$  (CE 10 eV, Argônio) selecionando o íon pseudomolecular  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$   $m/z$  494,00 (Figura 42) resultando nos fragmentos:  $m/z$  476,3715  $[\text{M}+\text{NH}_4-\text{H}_2\text{O}]^+$  (valor calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{NO}_4$  476,3734),  $m/z$  459,3428  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$  (calc. para  $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{O}_4$  459,3469) e  $m/z$  381,3119  $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_8\text{O}_4]^+$  (calc. para  $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{O}$  381,3152).

Figura 42: Espectro de experimento de MS2 (CE 10 EV, argônio) por ESI para o íon  $[M+NH_4]^+$   $m/z$  494,00 da substância F7.



A substância F7 foi então definida como 6 $\beta$ -acetóxi-colest-22-en-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,18-triol e denominada punicinol E.

As substâncias aqui descritas, punicinóis A-E (Figura 43), não foram relatadas tanto para *L.punicea* como para outros organismos. Por outro lado, compostos semelhantes com mesmo núcleo já foram isolados de diversos organismos marinhos, inclusive de octocorais, assim como a punicina (Figura 44) isolada por Epifânio e colaboradores (1998) da mesma espécie aqui trabalhada, como também outros derivados polioxigenados de colestanos isolados de outras espécies como *Sinularia* sp., *Isis hippuppuris* e *Sarcophyton elegans* (Figura 44) (LI et al. 2012; CHEN et al. 2011; MOLDOWAN et al. 1975).

Figura 43: Estruturas das substâncias F3-F7 denominadas punicinóis A-E.

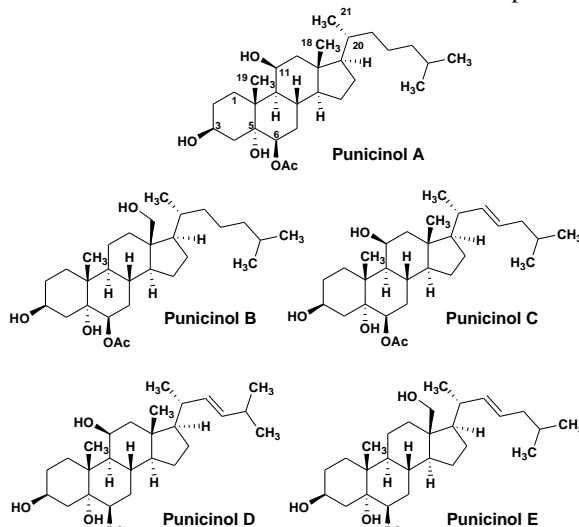
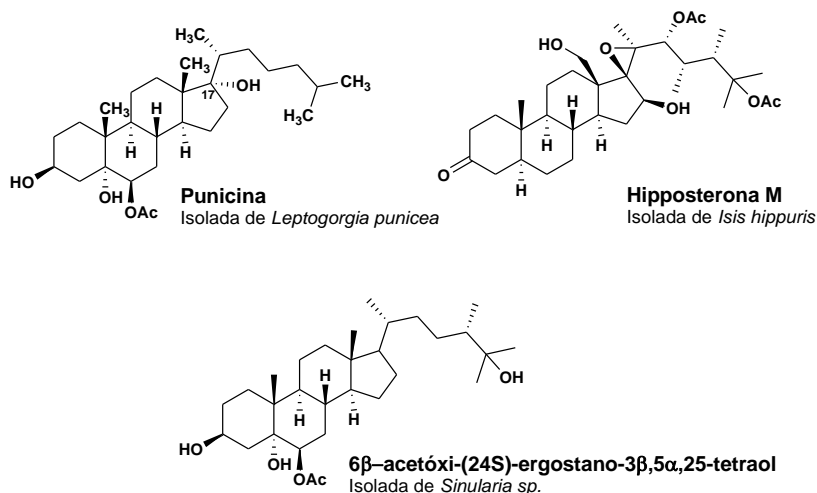


Figura 44: Estruturas de esteroides polioxigenados isolados de octocorais.



Antes da realização do isolamento das substâncias descritas acima, uma fração enriquecida com esteroides polioxigenados de polaridades semelhantes (Fração F2 da figura 8) foi avaliada quanto à sua atividade antimicrobiana\* e citotóxica\*\* pelos grupos de pesquisa citados anteriormente. Os ensaios de atividade antibacteriana estão descritos na tabela 7, a fração na concentração de 100 mg/mL apresentou halos de inibição de 8 mm para *S. aureus* e de 10,5 mm para *E. faecalis* nos ensaios de difusão em disco.

O ensaio antimicrobiano só foi possível ser realizado com a substância F3, devido ao rendimento maior dessa substância e foi testado contra *S. aureus* e *E. faecalis* e não apresentou inibição das cepas na concentração de 50 mg/mL.

Tabela 7: Ensaio antibacteriano e antifúngico com metodologia de difusão em disco.

Extratos/frações	Cepas bacterianas e fúngicas				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
F2 ( <i>L. punicea</i> )	+	++	-	-	-

(-): não ativo; (+): 5-8 mm; (++) : 9-12 mm; (+++) : 13-16 mm; (++++): 17-20 mm. Controles positivos: *S. aureus*: oxacilina (1 µg) 18-24 mm; *E. faecalis*: ampicilina (10 µg) >17 mm; *P. aeruginosa*: ceftazidina (30 µg) 22-29 mm; *E. coli*: ampicilina (10 µg) 16-22 mm; *C. albicans*: fluconazol (25 µg) >19 mm. F2 = fração da coluna 1 com o extrato em etanol de *L. punicea*.

\* O ensaio foi realizado pela doutoranda Tatiana da Rosa Guimarães – Laboratório de Farmacognosia

\*\* O ensaio foi realizado pelo doutorando Lucas Lourenço Marostica – Laboratório de Virologia Aplicada

Por outro lado, na avaliação da atividade antiviral e citotóxica para a linhagem A549 de câncer de pulmão, a fração F2 de *Leptogorgia punicea*



apresentou atividade citotóxica para a linhagem A549 com  $CI_{50} = 5,13 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 8). A atividade antiviral foi avaliada contra o HSV1, a fração apresentou IS (índice de seletividade =  $CC_{50} \text{ células vero} / CE_{50} = 4,39$ ).

Tabela 8: Ensaio citotóxico e antiviral da fração F2.

Fração	Citotoxicidade	Citotoxicidade	Antiviral	IS
	$CI_{50}(\mu\text{g/mL})$	$CC_{50}(\mu\text{g/mL})$	$CE_{50}(\mu\text{g/mL})$	$CC_{50}\text{VERO}/$
	A549	VERO	HSV1	$CE_{50}\text{HSV1}$
F2 ( <i>L. punicea</i> )	5,13	5,36	1,22	4,39

Considerando os resultados promissores para a fração F2 quanto à atividade citotóxica frente à linhagem de células não pequenas de pulmão (A549), os estudos para essa atividade foram continuados com as substâncias isoladas punicinóis A-E através de colaboração com o laboratório de virologia aplicada, trabalho em colaboração com o estudante Lucas Marostica, deste Programa de Pós-Graduação, sob a orientação da Professora Cláudia Simões.

Através dos resultados obtidos (Tabela 9) foi possível observar uma maior atividade para as substâncias punicinol A e B após 48 horas de tratamento, apresentando  $CI_{50}$  de 9,6 e 9,7  $\mu\text{M}$  respectivamente.

Tabela 9: Ensaio in vitro de citotoxicidade contra linhagem de células não pequenas de pulmão (A549) depois de 24 e 48 h de tratamento. Apresentação de valores através de desvio padrão de três experimentos independentes.

Punicinol	$CI_{50}$ 24 h ( $\mu\text{M}$ )	$CI_{50}$ 48 h ( $\mu\text{M}$ )
A	$11,8 \pm 1,4$	$9,6 \pm 1,1$
B	$13,6 \pm 2,1$	$9,7 \pm 1,7$
C	$47,9 \pm 1,5$	$35,9 \pm 1,4$
D	$81,3 \pm 5,0$	$73,3 \pm 0,6$
E	$59,0 \pm 2,1$	$35,8 \pm 1,0$
Cisplatin	$24,8 \pm 2,1$	$16,2 \pm 2,4$
Paclitaxel	$> 1,0$	$0,247 \pm 0,04$

Para as duas substâncias mais promissoras, punicinol A e B, foram ainda realizados ensaios de efeito clonogênico das células A549, o que resultou numa inibição do crescimento celular após 24 horas de tratamento por 10 dias de monitoramento. Também foi realizado o ensaio de efeitos no ciclo celular e como resultado se pode observar que para a substância punicinol A ocorreu

repressão da fase G0/G1 e para a substância punicinol B na fase G2M, esses dados podem explicar a atividade citotóxica por inibição dessas fases do ciclo celular e ainda destaca a diferença de atuação das duas substâncias testadas.

Por fim, foram realizados ensaios de sinergismo entre as substâncias punicinol A e B e os fármacos antitumorais paclitaxel e cisplatina. As duas substâncias apresentaram sinergismo com paclitaxel, principalmente punicinol A, que apresentou um sinergismo forte com concentrações de 0,310  $\mu\text{M}$  de punicinol A e 0,008  $\mu\text{M}$  de paclitaxel. Esses dados estão compilados em publicação submetida (referência em anexo).

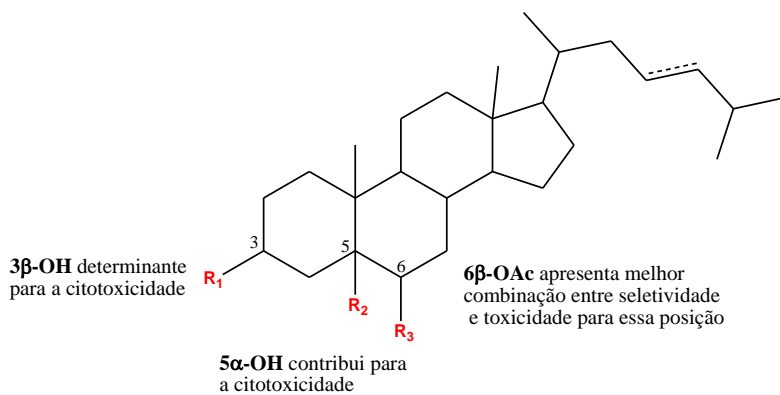
Esses compostos têm se mostrado promissores quanto sua atividade citotóxica em diferentes linhagens tumorais também para o gênero *Leptogorgia* (GARRIDO et al. 2000; BOONANANWONG et al. 2008). Entretanto, essas substâncias descritas para *Leptogorgia sarmentosa*, que apresentam como porções importantes da molécula para a citotoxicidade o grupamento cetona  $\alpha,\beta$  insaturada no anel A e a presença de uma hidroxila no carbono 16 ao invés de uma cetona nessa posição, essas substâncias são estruturalmente diferentes dos esteroides aqui descritos para realizar uma comparação de relação-estrutura atividade entre elas. Portanto, com o objetivo de analisar as estruturas aqui descritas, com estudos anteriores de relação estrutura-atividade, outros esteroides de esqueletos semelhantes foram considerados. Em um estudo de síntese de esteroides polioxigenados obtidos por reações de síntese enzimática, apresentou resultados interessantes para a atividade citotóxica frente as linhagens HT-29, LAMA-84, HepG2, A549, PC3, e MCF-7. Esse estudo destacou a importância do grupamento acetila na posição 6 $\beta$ , resultando em melhores resultados e de uma hidroxila livre na posição 3 $\beta$ , que parece ser crucial para a atividade.

Metodologias para síntese dessa classe de compostos a partir de precursores mais abundantes também estão sendo desenvolvidas e empregadas para ensaios de relação estrutura-atividade (CARVALHO et al. 2010).

Outros estudos revelam a importância da cadeia lateral na inibição de células tumorais, ocorrendo uma diminuição da atividade no caso de oxidações no C-25, oxidação da hidroxila em 6 $\beta$  a uma cetona e pela presença de dupla ligação na posição 7 (WANG et al, 2013; LIU et al, 2013), substituições estas ausentes nos punicinóis A-E.

Assim, os efeitos citotóxicos dos punicinóis A-E são consistentes com a literatura, já que, apresentam as características mencionadas (Figura 45). No nosso estudo, a importância da cadeia lateral foi observada, pois os compostos menos ativos foram aqueles que apresentam dupla ligação na cadeia lateral (punicinóis C, D and E).

Figura 45: Relação estrutura atividade baseada em resultados de citotoxicidade ( $\text{CI}_{50}$ ) determinadas por CARVALHO et al., 2011 com substituintes também presentes nos punicinóis A-E.



**CAPÍTULO 2 – INVESTIGAÇÃO COM ORGANISMOS MARINHOS  
COLETADOS NA ARGENTINA**



## 6 INVESTIGAÇÃO COM ORGANISMOS MARINHOS COLETADOS NA ARGENTINA

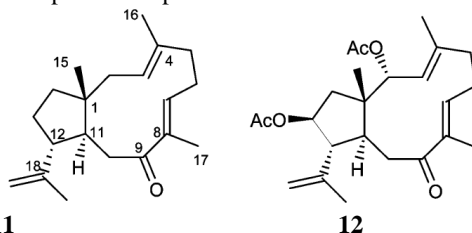
Durante a realização do doutorado foram desenvolvidas atividades de estágio doutoral em dois períodos na *Universidad de Buenos Aires*. Nesse período foram investigadas 17 espécies disponibilizadas pelo Professor Jorge Palermo, sob sua orientação. Todos os extratos foram avaliados quanto suas características químicas utilizando-se métodos cromatográficos e espectroscopia de RMN. Foram selecionados os mais promissores para seguir o isolamento, sendo esses descritos aqui os resultados obtidos para um octocoral ainda não identificado, codificado como L27 e duas esponjas ainda não identificadas codificadas como IB3 e EG13.

### 6.1 REVISÃO DE LITERATURA

A América do Sul abrange cerca de 30000 km de costa, abrangendo três domínios oceânicos, o Mar do Caribe, Atlântico e Pacífico. Estudos de endemismo relatam que 75% das espécies da América do Sul são descritas para somente uma das regiões, enquanto que cerca de 20% das espécies não foram descritos para nenhuma outra região do mundo. A plataforma patagônica, como é conhecida o mar que apresenta 5649 km de extensão, do norte do Uruguai ao sul da Argentina e Chile contém uma parte que geralmente apresenta uma profundidade de até 100 m é um dos ecossistemas de maior biodiversidade no Hemisfério Sul. Apenas 15,3% das espécies bênticas marinhas conhecidas no Brasil também são encontradas na Argentina, sugerindo que o estuário do Rio da Prata atua como barreira biogeográfica, já que o mar flui do sudoeste em direção ao nordeste. A biodiversidade marinha total da Argentina e do Uruguai é estimada em 3776 espécies e os invertebrados marinhos abrangem aproximadamente 75% desse total (MILOSLAVICH et al., 2011).

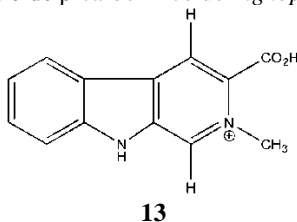
Estudos de metabolitos secundários de invertebrados marinhos do sul do Atlântico, encontrados na plataforma patagônica, foram realizados principalmente através de coletas de organismos por dragas em maior profundidade (93 m) associados às vieiras, como no caso da espécie *Convexella magelhaenica*, da qual foram isolados dois diterpenos do tipo dolabelano (11 e 12 – Figura 46) com atividade citotóxica para a linhagem PANC1 (carcinoma pancreático) com  $CI_{50}$  de 2,5  $\mu$ M e 17,8  $\mu$ M respectivamente, além da atividade citotóxica para a linhagem LM3 (células de adenocarcinoma de pulmão murino) com  $CI_{50}$  de 3,8  $\mu$ M e 398,1  $\mu$ M respectivamente. (ALMEIDA et al., 2010).

Figura 46: Diterpenos do tipo dolabelano de *Convexella magelhaenica*



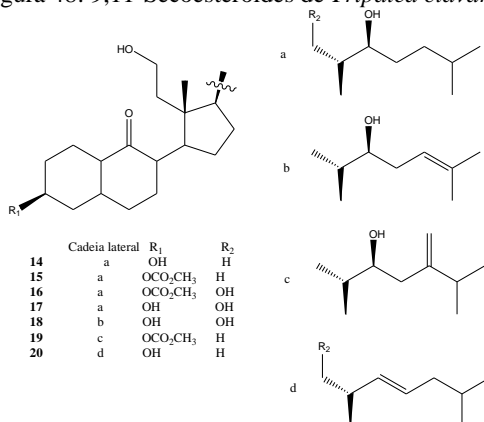
Do extrato etanólico do coral *Lignopsis spongiosum*, coletado em uma profundidade de 200 m, foi isolado um alcaloide (**13** – Figura 47), que apresentou um halo de inibição de 11 mm em ensaio de inibição da bactéria *E. coli* ATCC25922 em disco, na concentração de 50 µg/disco (CABRERA et al., 1999).

Figura 47: Alcaloide β-carbonílico de *Lignopsis spongiosum*.



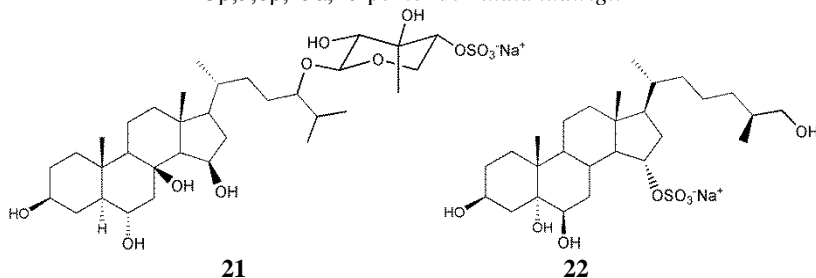
A investigação química do octocoral *Tripalea clavaria*, também proveniente do Atlântico sul, coletada em Mar del Plata, resultou no isolamento de sete 9,11-secoesteroides (**14-20** – Figura 48), duas dessas substâncias apresentaram atividade ao inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ensaio de inibição em disco, com halos de inibição de 8 mm para a substância **14**, na concentração de 25 µg/disco (BRASCO et al., 2007).

Figura 48: 9,11-Secoesteroides de *Tripalea clavaria*.



As estrelas marinhas do Atlântico sul também vêm sendo estudadas, resultando no isolamento de diversos esteroides polioxigenados glicosilados e/ou sulfatados. Da espécie coletada na costa Patagônica *Cosmasterias lurida* foram isolados o esteroide glicosilado sulfatado luridosídeo A (**21**- Figura 49) e o luridosídeo B (com uma instauração na posição 22) (MAIER et al., 1993) e para a espécie *Luidia ludwigi*, além de duas asterosaponinas e dois esteroides polioxigenados já descritos anteriormente para outras espécies foi também descrito um novo esteroide: sulfato de 5 $\alpha$ -colestano-3 $\beta$ ,5,6 $\beta$ ,15 $\alpha$ ,26-pentol (**22**) (ROCCATAGLIATA et al., 1995).

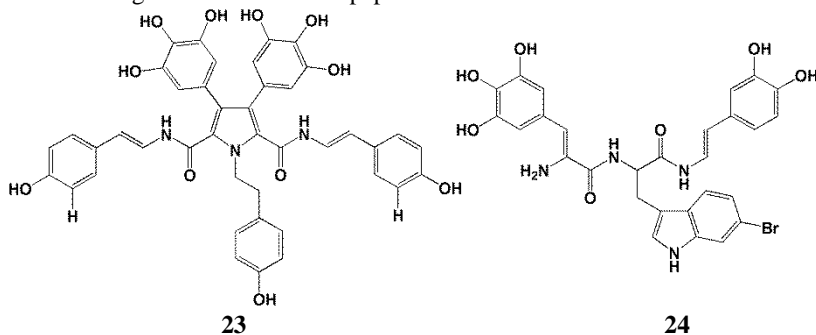
Figura 49: Luridosídeo a (**21**) de *Cosmasterias lurida* e sulfato de 5 $\alpha$ -colestano-3 $\beta$ ,5,6 $\beta$ ,15 $\alpha$ ,26-pentol de *Luidia ludwigi*.



Dentre as esponjas estudadas, uma espécie do gênero *Cliona* foi coletada na Província de Río Negro e seu estudo químico resultou no isolamento de alcaloides peptídicos como, por exemplo, a estornamida A (**23** – Figura 50) (PALERMO et al., 1996).

O mesmo grupo de pesquisa isolou da espécie *Cliona chilensis*, coletada através de mergulho autônomo na Província de Chubut, o alcaloide tripeptídico bromado denominado celenamida E (**24** –Figura 50); a substância apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis* e *M. luteus*) na concentração de 50  $\mu$ g/disco (PALERMO et al., 1998).

Figura 50: Alcaloide tripeptídico bromado *Cliona chilensis*.

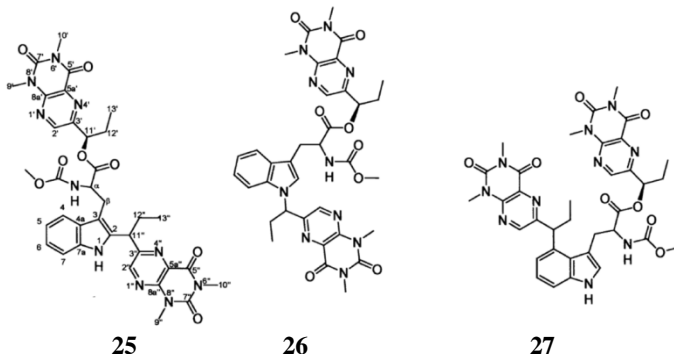


O estudo da espécie *Clathria* sp., também possível por ser parte da fauna acompanhante no momento da pesca por dragas, foi coletada como



espécie mais abundante na costa de Río Negro, Argentina. Para a esponja foi relatada a presença de alcaloides pteridínicos, as pseudoanchinazinas A-C (25-27 – Figura 51) (ZULETA et al., 2002).

Figura 51: Pseudoanchinazinas A-C DE *Clathria* sp.



Esses dados estimularam a pesquisa com outros organismos marinhos coletados na costa da Argentina, cujos resultados são apresentados a seguir.

## 7 MATERIAIS E MÉTODOS

### 7.1 COLETA

O coral codificado como L27 e as esponjas IB3 e EG 13, ainda estão sendo identificados e foram coletados de janeiro de 2008 a dezembro de 2009. A coleta foi realizada na região de Puerto Deseado ao norte da península de Valdés, na província de Chubut, Argentina.

### 7.2 OCTOCORAL L27

#### 7.2.1 Preparação dos Extratos

33 g do octocoral foram extraídos com etanol por cinco dias, seguido por extração com diclorometano. Os extratos foram reunidos, secos e ressuspensos em água e particionados com ciclohexano (cinco vezes com alíquotas de 100 mL de ciclohexano). O rendimento da fração ciclohexano foi de 447 mg.

#### 7.2.2 Isolamento e identificação dos compostos

##### Coluna CL1

A fração ciclohexano foi submetida a uma coluna (30 x 2 cm) com 30 g de gel de sílica em ciclohexano como fase móvel. Desta coluna foram obtidas 28 frações.

As frações semelhantes foram reunidas de acordo com a cromatografia de camada delgada utilizando ciclohexano e ciclohexano: diclorometano (1:1 v/v) como fase móvel.

Da fração 17-20, com rendimento de 69 mg, foi realizado um RMN de  $^1\text{H}$ , no qual observou-se que a substância estava pura o suficiente para sua elucidação estrutural.

IM19: Óleo transparente;  $[\alpha]_D = +0,064$  ( $c$  1,64 em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); RMN de  $^1\text{H}$  (Acetona- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta$  1,87 (1H, m, H-1),  $\delta$  1,48 (1H, m, H-2 $\beta$ ),  $\delta$  1,83 (1H, m, H-2 $\alpha$ ), 1,12 (1H, m, H-3 $\alpha$ ),  $\delta$  1,83 (1H, m, H-3 $\beta$ ),  $\delta$  1,76 (1H, m, H-4 $\alpha$ ),  $\delta$  0,19 (1H, d,  $J$  9,5 Hz, H-6 $\alpha$ ),  $\delta$  0,60 (1H, ddd,  $J$  11,0; 9,5; 5,5 Hz, H-7 $\alpha$ ),  $\delta$  1,28 (1H, m, H-8 $\alpha$ ),  $\delta$  1,80 (1H, m, H-8 $\beta$ ),  $\delta$  1,81 (2H, m, H-9),  $\delta$  1,94 (1H, m, H-10 $\alpha$ ),  $\delta$  1,25 (3H, s, H-12),  $\delta$  1,01 (3H, s, H-13),  $\delta$  0,83 (3H, d,  $J$  7,0 Hz, H-

14),  $\delta$  0,93 (3H, d,  $J$  6,5 Hz, H-15). Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  apresentados na tabela 10, página 78.

### 7.2.3 Reações de esterificação

Para a determinação da estereoquímica absoluta da estrutura foram realizadas tentativas de obtenção de derivados sintéticos do composto.

#### Acetilação da substância IM19

A 5,1 mg da substância foi adicionado 0,5 mL de anidrido acético e 0,5 mg de piridina como catalisador. A solução ficou em repouso por 24 horas, através de CCD foi verificada a formação do produto de menor polaridade do que a substância reagente. Uma extração da solução com água ácida (HCl 6 N) e acetato de etila foi realizada para a retirada da piridina. Como resultado a fração acetato de etila foi seca e 3 mg da mistura foi obtida. Uma coluna de purificação com gel de sílica foi realizada utilizando-se como fase móvel ciclohexano:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2:1 v/v). Após a separação, foi levado a seco por evaporador rotatório.

#### Metilação da substância IM19

Para a metilação da substância IM19, foi adicionado 2 equivalentes de NaH a 1 mL de DMSO em um balão sob agitação por 20 minutos. Esperou-se a solução tornar-se verde escuro e foi adicionada 5 mg da amostra e deixada sob agitação. Adicionar gota a gota  $\text{CH}_3\text{I}$  (1,2 equivalentes) por aproximadamente uma hora, até a reação se completar. Ao final foi adicionada água destilada e gotas de metanol para a realização da extração com acetato de etila.

#### Ésteres de Mosher

Ainda na tentativa de obter um derivado éster do aromadendranol obtido do octocoral, foram realizados os ésteres de Mosher como descrito (com alterações) por Ohtani e colaboradores (1991) (OHTANI et al., 1991). Primeiramente foi utilizado NaH para secar a piridina já anteriormente destilada por aproximadamente duas horas. Em dois balões foram pesados 1 mg em cada para a realização do derivado de Mosher R e S e adicionada a piridina seca e 6  $\mu\text{L}$  do cloridrato do ácido de MTPA (cloridrato do ácido de  $\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -trifluoro- $\alpha$ -metilfenilacético) em cada balão em condições anidras (com a utilização de  $\text{N}_2$ ).

Após duas horas da reação, foi realizada uma extração com acetato de etila e água ácida (HCl 6 N), a fração acetato de etila foi seca com nitrogênio. Para a purificação foram realizadas placas de sílica preparativa com fase móvel ciclohexano: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6:3 v/v) para os derivados R e S.

#### 7.2.4 RMN em acetona-d<sub>6</sub>

A substância IM19 foi submetida ao RMN de <sup>1</sup>H, NOESY, COSY e HSQC/Dept em acetona-d<sub>6</sub>, na tentativa de observar seus sinais da hidroxila e suas correlações.

### 7.3 ESPONJA IB3

#### 7.3.1 Preparação dos Extratos

657 g de esponja foi extraída em etanol comercial por sete dias. O extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório. Em seguida o extrato foi ressuspensionado em água e extraído em acetato de etila (3 x de 50 mL).

#### 7.3.2 Isolamento e identificação dos compostos

A fração acetato de etila foi novamente seca em evaporador rotatório e foi submetida a uma coluna de sílica (15 cm x 2cm). A fase móvel utilizada foi diclorometano. Foram obtidas 40 frações. Da fração 23 foi isolada uma substância denominada IBC1.

### 7.4 ESPONJA EG13

#### 7.4.1 Preparação dos Extratos

A esponja úmida foi extraída em etanol comercial por sete dias, após o extrato filtrado e seco no evaporador rotatório, o extrato foi ressuspensionado em água e extraído em acetato de etila (3 x de 50 mL). A fração acetato de etila foi novamente seca em evaporador rotatório resultando em 3,1 g de fração.

#### 7.4.2 Isolamento e identificação dos compostos

Coluna EG1

A fração acetato de etila foi submetida a um funil de gel de sílica sob vácuo utilizando como fase móvel ciclohexano com proporções crescentes de acetato de etila. As frações semelhantes foram reunidas, resultando em uma fração denominada A de 443,9 mg, uma denominada B de 277,4 mg e outra denominada C com 70 mg.

#### Coluna EG2

A fração A (443,9 mg) foi submetida a uma coluna com 30g de gel de sílica utilizando-se como fase móvel ciclohexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7:3 v/v), resultando em 35 frações. Nenhuma das frações apresentou sinais de RMN de <sup>1</sup>H de interesse.

#### Coluna EG3

50 mg da fração B foram submetidos a uma coluna de gel de sílica com fase móvel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:acetato de etila (1:1 v/v) resultando em 20 frações. As frações 5 e 6 foram reunidas e codificadas como EGC1.

#### Coluna EG4

70 mg da fração C foram submetidos a uma coluna de gel de sílica utilizando-se acetato de etila como fase móvel, foram obtidas 40 frações. As frações 15-22 foram reunidas e codificada como EGC2.

## 8 RESULTADOS E DISCUSSÃO - ORGANISMOS MARINHOS ARGENTINOS

### 8.1 OCTOCORAL L27

Uma parte do octocoral foi separada para a identificação do animal e o restante foi extraído e fracionado através de métodos cromatográficos para a busca de novas substâncias de interesse. As frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) e também por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), a fim de avaliar a riqueza química dos extratos e a possível presença de componentes promissores.

Com 33 g do octocoral foram realizadas sucessivas extrações com etanol. O extrato seco obtido foi novamente ressuspensão e particionado com ciclohexano, resultando em uma fração ciclohexano (447 mg). Uma cromatografia em camada delgada utilizando-se diclorometano como fase móvel, indicou a presença de uma substância majoritária, revelada com vanilina-sulfúrica com a cor rosa a qual foi isolada por fracionamento cromatográfico com rendimento de 69 mg, substância essa codificada como IM19. Para a análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em  $\text{CDCl}_3$ , foi separada uma parte da fração, cerca de 20 mg.

#### 8.1.1 Elucidação Estrutural da substância IM19

A substância IM19 foi obtida na forma de um óleo transparente.  $[\alpha]_{\text{D}} = +0,064$  (*c* 16,4 mg/mL em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). A análise de espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  determinou a presença de 15 carbonos (Figura 52). Um dos carbonos está localizado em  $\delta$  83,4, sugerindo a presença de um grupamento eletronegativo ligado a ele, no caso uma hidroxila. Em vista do resultado do espectro de massas de alta resolução com ionização por ESI, a massa da molécula cationizada  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  em  $m/z$  240,30 foi possível determinar a fórmula molecular como  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$ .

Na análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , um hidrogênio em região mais blindada do espectro em  $\delta$  0,20 (d, *J* 9,6) se destaca por ser uma região incomum e, juntamente com o sinal em  $\delta$  0,68 (ddd, *J* 9,6; 5,8; 2,0) (Figura 53), sugere a presença de um anel ciclopropila. Esse anel é conhecido por apresentar forte tensão no anel e efeito anisotrópico C-C, apresentando seus hidrogênios em região mais blindada. Dependendo de sua configuração, os hidrogênios do ciclopropano encontram-se geralmente na região entre  $\delta$  0,20 e  $\delta$  0,70. Além dos dois hidrogênios da ciclopropila, foram visualizadas quatro metilas em  $\delta$  1,06 (s),  $\delta$  1,27 (s),  $\delta$  0,88 (d) e  $\delta$  0,93 (d).

Figura 52: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância IM19 em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

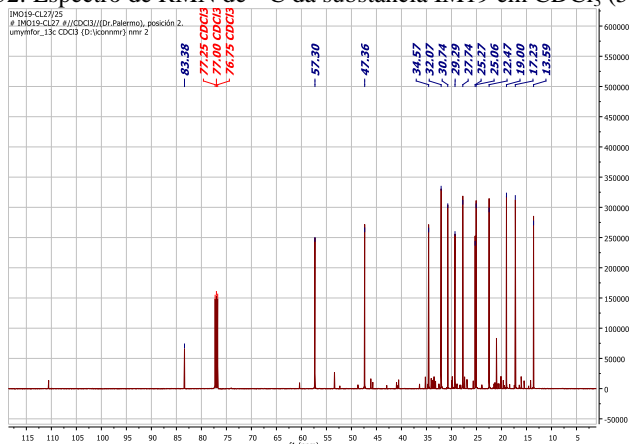
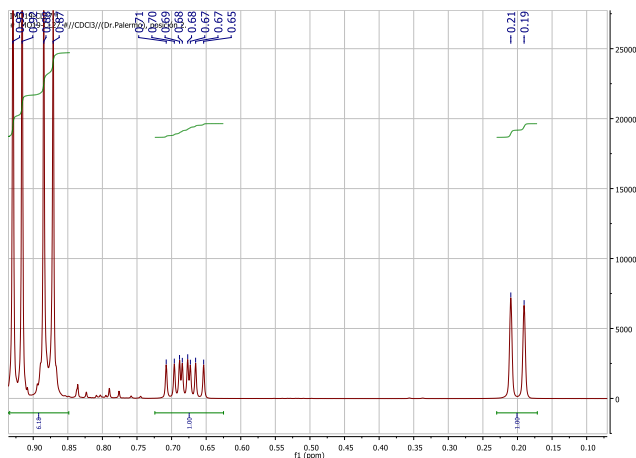


Figura 53: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância IM19 em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).



As atribuições dos carbonos e hidrogênios foram realizadas através de experimento de HSQC/DEPT. Para a elucidação da ciclopropila foram utilizados os dados de correlação de HMBC do hidrogênio em  $\delta$  0,68, sendo visualizadas correlações com os carbonos em  $\delta$  25,3,  $\delta$  21,0,  $\delta$  17,2,  $\delta$  30,8 e  $\delta$  83,4 (Figura 54). Uma busca na literatura de substâncias apresentando anel ciclopropila, obtidos de organismos marinhos, foi realizada para facilitar a elucidação da substância IM19. Dentre as substâncias encontradas estava os álcoois de sesquiterpeno do tipo germacreno, aromadendranois (Figura 55),

encontrado em algas, como de espécies do complexo *Laurencia* (WRATTEN; FAULKNER, 1977).

Figura 54: Ampliação do espectro de HMBC da substância IM19.

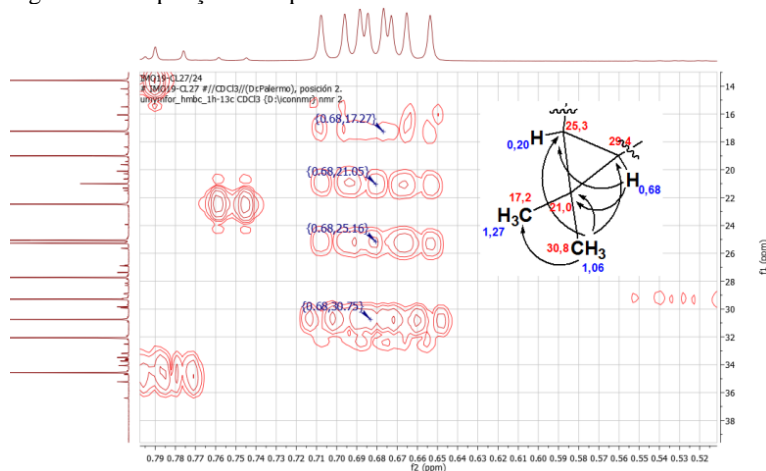
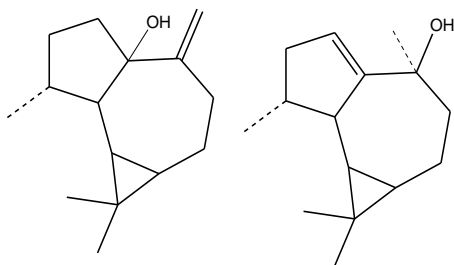


Figura 55: Estruturas relacionadas encontradas na literatura 1-hidroxisaloomadendreno e 10 $\beta$ hidroxi- $\delta$ 1-2-aromadendrenol.



Fonte: Wratten; Faulkner, (1977).

Por outro lado, realizando a busca com base na similaridade estrutural utilizando o SciFinder® foi encontrada a uma estrutura com valores semelhantes de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 56) isolada de uma planta chamada *Conocephalum conicum* (MELCHING et al. 1999). Para essa estrutura, a literatura apresenta apenas os dados para os hidrogênios, os quais são muito próximos aos observados para a substância IM19 (Tabela 10).

A análise detalhada das correlações de COSY e HMBC, conforme a figura 57 permite concluir que se trata da mesma estrutura, mais especificadamente o aromadendran-5-ol, restando confirmar alguns dados de estereoquímica.



Figura 56: Estrutura isolada da planta *Conocephalum conicum* (-)-aromadendran-5-ol (MELCHING et al., 1999).

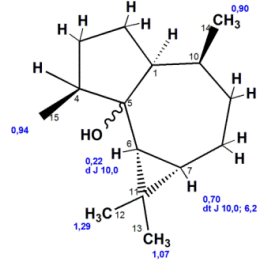


Figura 55: Substância IM19 e seus valores de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ .

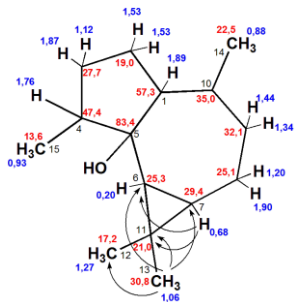


Tabela 10: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  da substância IM19 e RMN de  $^1\text{H}$  da substância (-)-aromadendran-5-ol isolada de *Conocephalum conicum*.

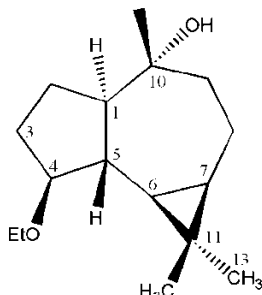
Posição	IM19 (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ )		Melching et al 1999 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
	C	H	H
1	57,3	1,89	
2	19,0	1,53	
3	27,7	1,12; 1,87	
4	47,4	1,76	
5	83,4	-	
6	25,3	0,20 (d J 9,6)	0,22 (d J 10,0)
7	29,4	0,68 (ddd J 9,6; 5,8; 2,0)	0,70 (dt J 10, 6, 2)
8	25,1	1,90; 1,20	
9	32,1	1,44; 1,34	
10	35,0	1,90	
11	21,0	-	
12	30,8	1,06	1,07
13	17,2	1,27	1,29
14	22,5	0,88	0,90
15	13,6	0,93	0,94

Para a determinação da estereoquímica absoluta da estrutura foram realizadas tentativas de obtenção de derivados sintéticos do composto, no entanto, essas reações não resultaram em nenhum produto possível de analisar.

A análise de RMN de  $^1\text{H}$  dos produtos esperados da reação de metilação e acetilação da substância IM19 não apresentou sinais referentes a amostra após a purificação por coluna, o que poderia ser devido à volatilidade das substâncias obtidas. A reação de esterificação com o cloridrato do ácido de MTPA (ácido de Mosher) resultou na formação de produtos, tanto para o reagente R quanto para o S, mas ao ser analisado seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , não se observaram os sinais referentes ao anel ciclopropila, sugerindo a abertura do anel.

Na literatura, substâncias também derivadas do aromadendrano isoladas anteriormente para organismos marinhos, como nas lochmolinas A-G isoladas do octocoral *Sinularia lochmodes*, por exemplo, a lochmolina B (Figura 58), apresenta hidrogênios nas posições 1 e 5 em *trans* e a ciclopropila, no mesmo lado do H-5 $\beta$  (TSENG et al, 2012).

Figura 58: Substância isolada de *Sinularia lochmodes*, lochmolina B.



Alguns sinais de correlação de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY não são observados no espectro obtido em  $\text{CDCl}_3$ , por essa razão foram realizados espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e experimentos de COSY, NOESY e HSQC/DEPT em acetona- $\text{d}_6$  RMN. Com a mudança de solvente foi possível verificar se havia o aparecimento do sinal de hidrogênio da hidroxila e suas correlações NOE (Figura 59).

Em comparação com os espectros obtidos em  $\text{CDCl}_3$ , os sinais de correlações de NOE e através da utilização de um modelo foi possível fazer a proposta da estereoquímica. As correlações observadas entre o H-1 e H-10, além das correlações entre as metilas 14 e 15 e os H-6 e H-7 definem a posição do anel ciclopropila. Ao analisar o modelo molecular as correlações de NOESY só são possíveis se a hidroxila estiver em  $\alpha$ . Esses dados indicam a estereoquímica relativa da substância IM19, conforme na figura 60. Para a determinação completa da estrutura, serão realizadas outras técnicas de determinação estrutural como a difração de raio-x de monocristais e outros experimentos de NOESY.

Figura 59: Espectro de NOESY da substância IM19 em acetona- $d_6$ .

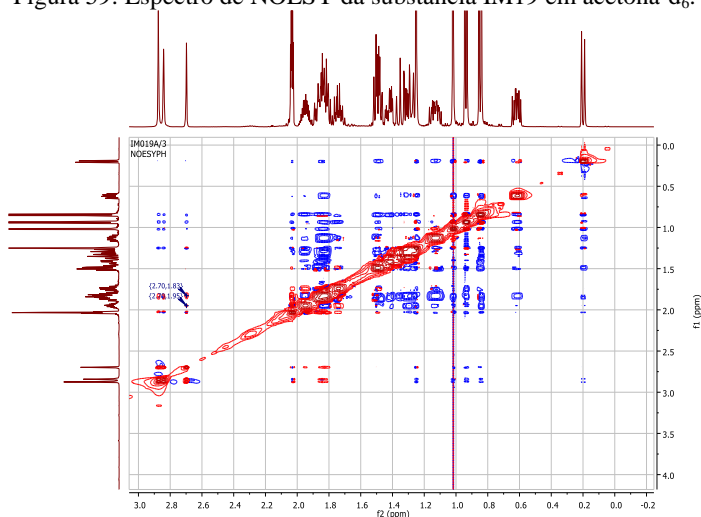
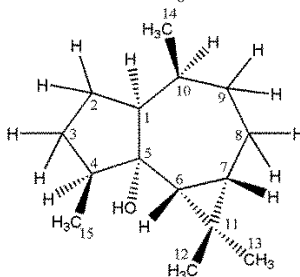


Figura 60: Representação da estereoquímica relativa da substância IM19 com valores de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em acetona- $d_6$ .



A substância IM19, (+)-aromadendran-5-ol, foi avaliada quanto à atividade anti-herpética (cepa KOS). Os resultados não foram muito promissores, com uma  $\text{CI}_{50}$  de 60,3  $\mu\text{g/mL}$  e um índice de seletividade de 0,6 para a atividade antiviral HSV-1 (KOS) após 48 h de tratamento (Dr. J. Kratz e Dra. C.M.O. Simões – dados não publicados).

## 8.2 ESPONJA IB3

A esponja IB3, coletada na região ao norte da península de Valdés, na província de Chubut, Argentina em dezembro de 2009, estava congelada para futuras análises.

### 8.2.1 Preparação de extratos e isolamento

O material obtido foi extraído com etanol e o extrato seco ressuspendido em água e particionado com acetato de etila. Essa fração (225 mg) apresentava uma substância com extinção de fluorescência em 255 nm e não foi visualizada cor ao revelar com vanilina-sulfúrica. A substância foi isolada através de coluna cromatográfica e codificada como IBC1.

### 8.2.2 Elucidação Estrutural da substância IBC1

A massa obtida através da espectrometria de massas de alta resolução, com ionização por ESI indicou a massa da molécula cationizada  $[M+H]^+$  em  $m/z$  223,971, indicando a fórmula de  $C_9H_6BrNO$  (calc. 223,971 para  $C_9H_7BrNO$ ) (Figura 61). Através dos sinais de RMN de  $H^1$ , foi possível observar um sinal em  $\delta$ 10,06 sugerindo a presença de um aldeído e sinais na região entre  $\delta$  7,40 e  $\delta$  8,20 indicando anel aromático com integrais para quatro hidrogênios. A análise detalhada das constantes de acoplamento e comparação com dados de literatura (Figura 60) permitiu concluir tratar-se de um anel indólico (MURATORE et al., 2012). Considerando ainda a presença de um grupo aldeído foi possível identificar essa estrutura como o bromoindol, 6-bromo-1H-indol-3-carboxaldeído. Essa substância foi isolada anteriormente para outras espécies de organismos marinhos, como para a espécie de esponja da Tailândia *Smenospongia* sp. (PRAWAT et al., 2012) e para alga *Saccharina japonica* (= *Laminaria japonica*) (WANG et al., 2013).

Figura 61: Espectro de massas de alta resolução por ESI (modo positivo) da substância IBC1.

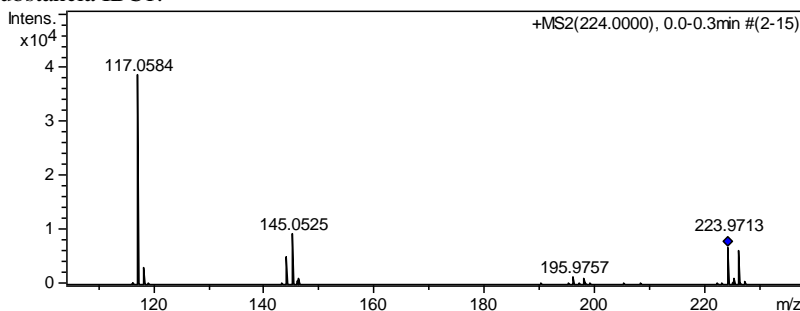
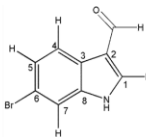
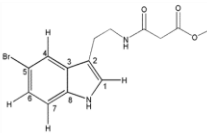
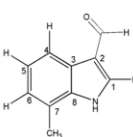
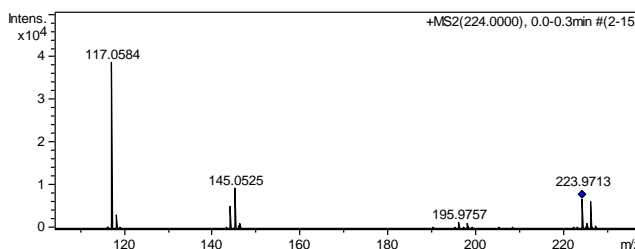


Figura 62: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  da Substância IBC1 e de outros dois indóis da literatura para comparação.

					
Posição	$^1\text{H}$ (mult. e $J$ em Hz) 200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ICB1	$^1\text{H}$ (mult. e $J$ em Hz) 600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ (Wang et al., 2013)	$^1\text{H}$ (mult. e $J$ em Hz) 400 MHz, $\text{CDCl}_3$ (Muratore et al., 2012)	$^1\text{H}$ (mult. e $J$ em Hz) 400 MHz, $\text{Acetona}-d_6$ (Muratore et al., 2012)	
1	7,84 (d; $J$ 2,9 Hz)	8,32 (s; $J$ 3,0 Hz)	7,06 (s)	8,16 (d; $J$ 3,0 Hz)	
4	8,20 (d; $J$ 8,4 Hz)	8,03 (d; $J$ 8,4 Hz)	7,72 (d; $J$ 1,5 Hz)	7,09 ou 7,5 (d; $J$ 7,5 Hz)	
5	7,43 (dd; $J$ 8,4 e 1,4 Hz)	7,37 (d; $J$ 8,4 e 1,5 Hz)	-	7,16 (t; $J$ 7,5 Hz)	
6	-	-	7,27 (dd; $J$ 8,5 e 1,5 Hz)	7,09 ou 7,5 (d; $J$ 7,5 Hz)	
7	7,63 (d; $J$ 1,4 Hz)	7,72 (d; $J$ 1,5 Hz)	7,24 (d; $J$ 8,5 Hz)	-	

Através do experimento CID de  $\text{MS}^2$  da molécula cationizada  $[\text{M}+\text{H}]$   $m/z$  224, foi possível verificar a formação das moléculas cationizadas resultantes das perdas do aldeído ( $m/z$  195,976) e do bromo ( $m/z$  145,053), e da perda de ambos ( $m/z$  117,058) (Figura 63).

Figura 63: Experimento CID de  $\text{MS}^2$  da molécula cationizada  $[\text{M}+\text{H}]$   $m/z$  224.



### 8.3 ESPONJA EG13

A esponja EG13 foi coletada em janeiro de 2008 em Puerto Deseado próximo ao golfo San José, ao norte da península de Valdés, na província de Chubut; a amostra estava congelada para futuras análises.

### 8.3.1 Preparação de extratos e isolamento

A partir de 340 g do material descongelado foi preparado o extrato em etanol, o qual foi ressuspendido em água destilada e particionado com acetato de etila resultando na fração acetato de etila (3,1 g). Essa fração foi submetida a sucessivos processos cromatográficos, que resultaram no isolamento das substâncias EGC1 e da substância EGC2.

### 8.3.2 Elucidação Estrutural das substâncias EGC1 e EGC2

#### EGC1

A substância EGC1 foi isolada como um óleo transparente. O seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em 200 MHz (Figura 64) apresentou sinais em  $\delta$  9,86 (s), características de aldeídos aromáticos, e de sinais para um anel aromático em  $\delta$  7,80 (d) e  $\delta$  6,94 (d), o que foi suficiente para identificar a substância como a substância também comum em organismos marinhos, o p-hidróxi-benzaldeído (Figura 65).

Figura 64: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) da substância EGC1.

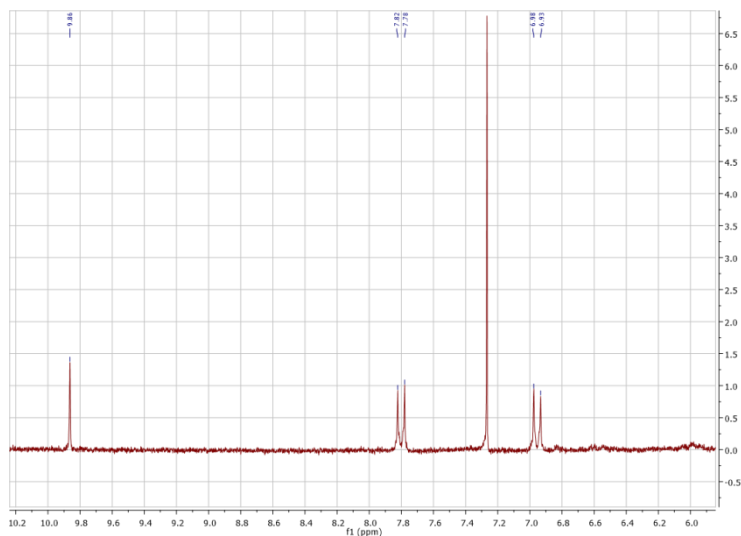
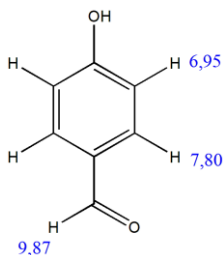


Figura 65: Estrutura da substância EGC1 - p-hidróxi-benzaldeído.



## EGC2

A substância EGC2 foi obtida na forma de sólido marrom. Inicialmente, ao realizar a análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  essa substância foi tratada como se fora uma substância pura, considerando a proporcionalidade das integrações (Figura 66). Os sinais nas regiões mais desblindadas do espectro entre  $\delta$  5,50 e  $\delta$  7,74, e sugerem presença de hidrogênios aromáticos, pirimidínicos ou purínicos como os presentes nas bases nitrogenadas.

No entanto, na análise detalhada do espectro de HMBC, observaram-se dois carbonos em  $\delta$  143,7 e  $\delta$  101,9 que não apresentavam correlações com o restante dos sinais de hidrogênio, o que mostrou tratar-se de duas diferentes moléculas em proporções semelhantes na mistura.

Ao analisar os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , foi observado que os sinais de carbono apresentam maior diferença na proporção entre as duas substâncias, sendo possível diferenciá-los principalmente os carbonos quaternários em  $\delta$  152,6;  $\delta$  153,7;  $\delta$  166,6 e  $\delta$  167,6 como mostra a figura 67.

Figura 66: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em MeOD (500 MHz) da substância EGC2.

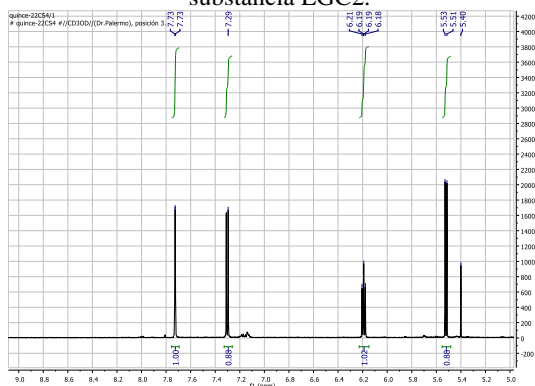
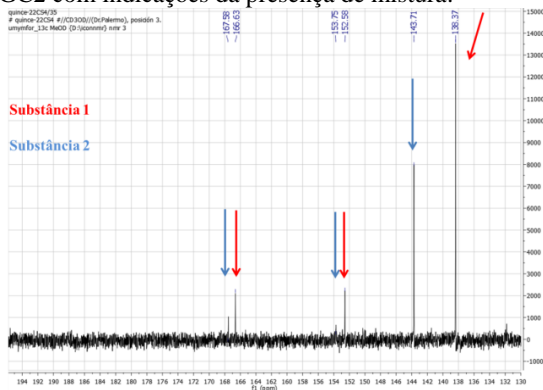
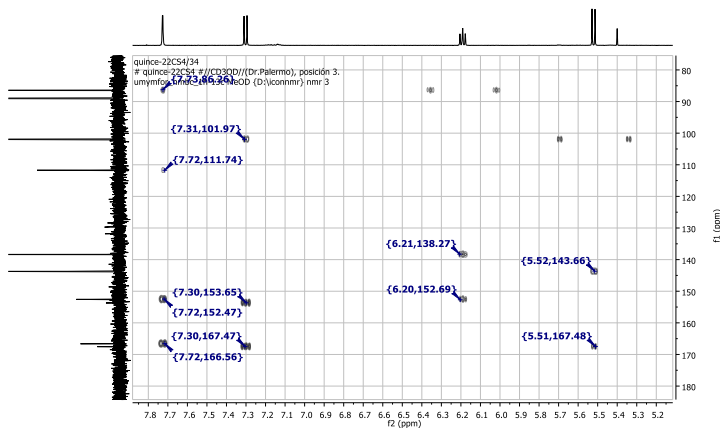


Figura 67: Ampliação do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) em MeOD da substância EGC2 com indicações da presença de mistura.



Para a elucidação estrutural das duas substâncias foram analisadas as correlações em HMBC, sendo que o sinal do hidrogênio em  $\delta$  7,73 apresenta correlações com os carbonos  $\delta$  12,6;  $\delta$  86,4;  $\delta$  110,1;  $\delta$  152,6 e  $\delta$  166,6 e o hidrogênio em  $\delta$  6,20 apresenta correlações com os carbonos em  $\delta$  152,6 e  $\delta$  138,4. Além disso, a metila em  $\delta$  1,79 apresenta COSY com o hidrogênio em  $\delta$  7,73. Já o sinal em  $\delta$  7,29, ligado ao carbono  $\delta$  143, 7, apresenta correlações em HMBC com os carbonos  $\delta$  101,9;  $\delta$  153,7; e  $\delta$  167,6 e o hidrogênio em  $\delta$  5,52 correlações em HMBC com os carbonos  $\delta$  143,7 e  $\delta$  167,6 (Figura 68).

Figura 68: HMBC em MeOD da substância EGC2 (125/500 MHz).



A figura 69 aponta os valores de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  das estruturas da timidina e uracila aqui elucidadas para a esponja IB3 e também, com o objetivo

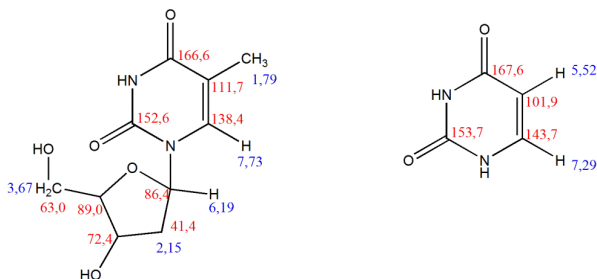


de comparação, os valores de RMN de  $^{13}\text{C}$  descritos por PRETSCH e colaboradores (1989).

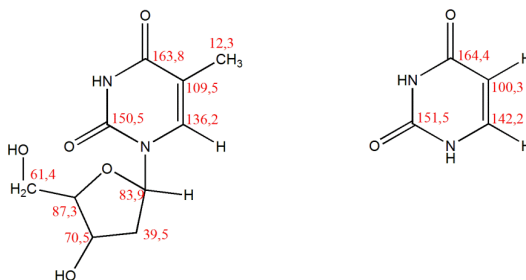
Através desses dados obtidos e comparação com os valores da literatura, foi possível definir as duas substâncias como timidina e uracila, podendo ser diferenciados os sinais de cada um.

Figura 69: Estrutura das substâncias timidina e uracila da mistura EGC2 e seus valores de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e dados de  $^{13}\text{C}$  da literatura para as substâncias.

Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de timidina e uracila da mistura EGC2



Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de timidina e uracila da Literatura (PRETSCH et al., 1989)



A substância EGC2 foi identificada como o nucleosídeo timidina em mistura com uma a base nitrogenada uracila.



## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante a realização do trabalho foram estudadas diversas espécies, aqui foram apresentadas somente as que resultaram no isolamento de substâncias com potencial atividade biológica.

Dentre as espécies estudadas coletadas na costa de Santa Catarina, está a esponja incrustante *Dragmaxia anomala*, a esponja em fase de identificação do gênero *Haliclona* e um octocoral do gênero *Renilla*. Para as esponjas *D. anomala* e *Haliclona* sp., apesar de resultados interessantes quanto a atividade biológica de seus extratos brutos (BIANCO et al., 2013), não foi possível determinar as suas substâncias ativas, principalmente pela complexidade do material utilizado. A espécie *Renilla* sp. não foi obtida em quantidade suficiente para obter as substâncias de interesse, sendo possível somente identificar os esteroides mono-oxigenados comuns aos organismos marinhos.

Foram ainda estudadas cerca de 20 espécies do Sul da Argentina, as quais não se apresentaram promissoras quanto a sua química, não resultando no isolamento de substâncias de interesse.

Os resultados obtidos com os octocorais foram os mais interessantes, demonstrando a importância da investigação desses organismos.

O estudo com *Leptogorgia punicea*, mesmo se tratando de uma espécie já estudada anteriormente com uma espécie coletada no Rio de Janeiro, resultou na obtenção de novos compostos o que poderia ser devido a variação de local de coleta. A substância isolada da espécie estudada por Epifânio e colaboradores (1998), apesar de bastante semelhante aos esteroides descritos aqui, não foi encontrada para a espécie coletada em Florianópolis.

Do octocoral CL27, foi isolado e caracterizado um 5-aromadendranol, que apesar de dificuldade no estabelecimento de sua estereoquímica absoluta, a proposta de sua estrutura parcial já indica algumas características que podem ser comparadas a outras estruturas isoladas anteriormente. Os sesquiterpenos desse tipo, caracterizados pela fusão de um ciclopropano com um esqueleto de hidroazuleno, já foram bastante estudados e isolados de plantas como a *Renealmia chrysotrycha*, cujo estudo resultou na caracterização da estereoquímica do ledol por RMN (KAPLAN et al., 2000). A estereoquímica desses compostos é de difícil determinação, sendo comuns os dados obtidos na literatura não serem completos e claros, apresentando ambiguidades. Estudos de síntese do (-)-aromadendreno e outros sesquiterpenos relacionados, como ledol, globulol, alloaromadendreno e viridoflorol foram realizados para elucidar sua estereoquímica, corrigindo erros encontrados na literatura (BÜCHI; HOFHEINZ; PAUKSTELIS, 1969). Para o (-)-aromadendran-5-ol, a literatura apresenta dados incompletos, com poucos dados de hidrogênio apenas (MELCHING et al., 1999).

Como perspectivas, foram obtidos dois novos octocorais, em coleta no nordeste brasileiro, já identificadas\*. Em triagem inicial, esses corais apresentaram-se interessantes cromatograficamente.

Novos estudos com o octocoral *Leptogorgia punicea* e os esteroides polioxigenados são necessários a fim de obter em maior quantidade essas substâncias de forma a permitir a realização de modificações estruturais e o aprofundamento da investigação biológica. Dessa forma, os estudos de mecanismo de ação de atividade citotóxica poderão ser aprimorados, bem como a avaliação da atividade citotóxica frente a outras linhagens de células tumorais e a busca por novas atividades biológicas.

O aromadendran-5-ol isolado do octocoral coletado na Argentina, ainda será testado frente a outras atividades biológicas e novos derivados serão obtidos para a determinação de sua estereoquímica absoluta.

\* Coleta realizada em colaboração com o Prof. Dr. Carlos Daniel Pérez da UFPE com identificação das espécies realizadas por ele.

## 10. CONCLUSÕES

A fração hexano obtida do octocoral *L. punicea* mostrou atividade antibacteriana frente as cepas de *S. aureus* e *E. faecalis* em ensaio de difusão em disco na concentração de 100 mg/mL, atividade anti-herpética (HSV-1), frente a cepa KOS (IS: 4,39) e citotóxica frente a linhagem A549 de células não-pequenas de pulmão (CI<sub>50</sub>: 5,13 µg/mL).

A análise dessa fração ativa conduziu ao isolamento de cinco esteroides cujas estruturas foram elucidadas através de métodos espectroscópicos e espectrometria de massas de alta resolução como:

6β-acetóxi de colestan-3β,5α,19-triol

6β-acetóxi de colestan-3β,5α,11β-triol

6β-acetóxi de colest-22-en-3β,5α,11β-triol

24-nor-6β-acetóxi de colest-22-en-3β,5α,11β-triol

6β-acetóxi de colest-22-en-3β,5α,18-triol.

As cinco substâncias são novas e foram denominadas punicinóis A-E.

As substâncias punicinóis A-E foram testadas quanto a sua atividade citotóxica e apresentaram resultados promissores frente à linhagem A549 de células não-pequenas de pulmão com valores de CI<sub>50</sub> entre 9,6–81,3 µM. Além disso, foi constatado o sinergismo entre as substâncias punicinol A e B com o fármaco antitumoral paclitaxel.

O estudo químico de organismos marinhos coletados na Argentina resultou no isolamento das substâncias já conhecidas como (+)-aromadendran-5-ol, 5-bromo-1H-indol-3-carboxaldeído, p-hidroxibenzaldeído, timidina e uracila.

A substância (+)-aromadendran-5-ol foi testada quanto a sua atividade anti-herpética (HSV-1, cepa KOS) resultando em um índice de seletividade de 0,6.

## 9 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.T.R.; SILESS, G.E.; PEREZ, C.D.; VELOSO, M.J.; SCHEJTER, L.; PURICELLI, L.; PALERMO, J.A. Dolabellane Diterpenoids from the South Atlantic Gorgonian *Convexella magelhaenica*. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 1714-1717, 2010.

ALMEIDA, M.T.R.; MORITZ, M.I.G.; CAPEL, K.C.C.; PÉREZ, C.D. Chemical and biological aspects of octocorals from the Brazilian coast. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 446-467, 2014.

ALVAREZ, B.; VAN SOEST, R.W.M.; RÜTZLER, K. A Revision of Axinellidae (Porifera: Demospongiae) in the Central West Atlantic Region. **Smithsonian Contributions to Zoology**, v. 598, p. 25-28, 1998.

AOKI, S.; CAO, L.; MATSUI, K.; RACHMAT, R.; AKIYAMA, S.; KOBAYASHI, M. Kendarimide A, a novel peptide reversing P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells, from a marine sponge of *Haliclona* sp. **Tetrahedron**, v. 60, p. 7053-7059, 2004.

ARANTES, R.C.M., MEDEIROS, M.S. Primeiro registro de *Anthothela grandiflora* (Sars, 1856) (Cnidaria, Octocorallia, Anthothelidae) no Brasil. **Arquivos do Museu Nacional**, v. 64, p. 11-17, 2006.

ARANTES, R.C.M., CASTRO, C.B., PIRES, D.O., SEOANE, J.C.S. Depth and water mass zonation and species associations of cold-water octocoral and stony coral communities in the southwestern Atlantic. **Marine Ecology Progress Series**, v. 397, p. 71-79, 2009.

AVILA, C.; TABOADA, S.; PONS, L.N. Antarctic marine chemical ecology: what is next? **Marine Ecology**, v. 29, p.1-71, 2008.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, p.679-688, 2009.

BENVEGNETTI, R.; CIMINO, G.; DE ROSA, S.; DE STEFANO, S. Guggulsterol-like steroids from the Mediterranean gorgonian *Leptogorgia sarmentosa*. **Experientia**, v. 38, p. 1443-1444, 1982.

BERLINCK, R.G.S.; HAJDU, E.; ROCHA, R.M.; OLIVEIRA, J.H.H.L.; HERNÁNDEZ, I.L.C.; SELEGHIM, M.H.R.; GRANATO, A.C.; ALMEIDA, E.V.R.; NUÑEZ, C.V.; MURICY, G.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.;

MORAES, M.O.; CAVALCANTI, B.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; THIEMANN, O.; SILVA, M.; SOUZA, A.O.; SILVA, C.L.; MINARINI, P.R.R. Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, v.67, p.510-522, 2004.

BIANCO, E.M.; OLIVEIRA, S.Q.; RIGOTTO, C.; TONINI, M.L.; GUIMARÃES, T.R.; BITTENCOURT, F.; GOUVEA, L.P.; ARESI, C.; ALMEIDA, M.T.R.; MORITZ, M.I.G.; MARTINS, C.D.L.; SCHERNER, F.; CARRARO, J.L.; HORTA, P.A.; REGINATTO, F.H. STEINDEL, M.; SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. Anti-Infective Potential of Marine Invertebrates and Seaweeds from the Brazilian Coast. **Molecules**, v. 18, p.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; SORHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine. **Natural Products Reports**, v. 22, p. 15-61, 2005.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; SORHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine. **Natural Products Reports**, v. 28, p. 196-268, 2011.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; KEYZERS, R.A.; MUNRO, M.H.G.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Products Report**, v. 31, p. 160-258, 2014.

BOONANANWONG, S.; KONGKATHIP, B.; KONGKATHIP, NGAMPONG. First synthesis of 3,16,20-polyoxygenated cholestanes, new cytotoxic steroids from the gorgonian *Leptogorgia sarmentosa*. **Steroids**, v.73, p. 1123-1127, 2008.

BRASCO, M.F.R.; GENZANO, G.N.; PALERMO, J.A. New C-secosteroids from the gorgonian *Tripalea clavaria*. **Steroids**, v.72, p. 908-913, 2007.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Bulário Eletrônico ANVISA. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/index.asp](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/index.asp)>. Acesso em 04/06/2014.

BREEDY, O. Octocorals. In: I.S. WEHRTMANN and J. CORTÉS (Eds.). **Marine Biodiversity of Costa Rica, Central America**. Berlin: Springer Verlag, 2009. p.161-167

BREEDY, O.; GUZMAN, H.M. A revision of the genus *Leptogorgia* Milne Edwards & Haime, 1857 (Coelenterata: Octocorallia: Gorgoniidae) in the eastern. Pacific **Zootaxa**, v.1419, p.1-90, 2007.

CABRERA, G.M.; SELDES, A.M. A  $\beta$ -Carboline Alkaloid from the Soft Coral *Lignopsis spongiolum*. *Journal of Natural Products*, v. 62, p. 759-760, 1999.

CARBALLEIRA NM, MONTANO N, CINTRON GA, MARQUEZ C, RUBIO CF, PRADA CF, BALANA-FOUCE R. First total synthesis and antileishmanial activity of (Z)-16-methyl-11-heptadecenoic acid, a new marine fatty acid from the sponge *Dragmaxia undata*. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 164, p. 113–117, 2011.

CARVALHO, J.F.S.; SILVA, M.C.; MOREIRA, J.N.; SIMÕES, S.; SÁ E MELO, M.L. Sterols as Anticancer Agents: Synthesis of Ring-B Oxygenated Steroids, Cytotoxic Profile, and Comprehensive SAR Analysis. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, p. 7632-7638, 2010.

CASAPULLO, A.; PINTO, O.C.; MARZOCCO, S.; AUTORE, G.; RICCIO, R. 3-Alkylpyridinium Alkaloids from the Pacific Sponge *Haliclona* sp. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 301-303, 2009.

CASTRO, C.B., MEDEIROS, M.S., LOIOLA, L.L. Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa) from Brazilian reefs. **Journal of Natural History**, v. 44, p. 763-827, 2010.

CHEN, W.; WANG, S.; DUH, C. Polyhydroxylated Steroids from Bamboo Coral *Isis hippuris*. **Marine Drugs**, v. 9, p. 1829-1839, 2011.

CIMINO, G.; DE ROSA, S.; DE STEFANO, S.; SODANO, G. 18-Hydroxy steroids from the Mediterranean gorgonian *Leptogorgia sarmentosa*. **Experientia**, v. 40, p. 246–248, 1984.

COSTA-LOTUFO, L.V.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P.C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

CREWS, P.; HARRISON, B. New Triterpene-ketides (Merotriterpenes), Haliclotriol A and B, from na Indo-Pacific *Haliclona* Sponge. **Tetrahedron**, v. 56, p. 9039-9046, 2000.

DALY, M.; BRUGLER, M.R.; CARTWRIGHT, P.; COLLINS, A.G.; DAWSON, M.N.; FAUTIN, D.G.; FRANCE, S.C.; MCFADDEN, C.S.; OPRESKO, D.M.; RODRIGUEZ, E.; ROMANO, S.L.; STAKE, J.L. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. **Zootaxa**, v. 1668, p. 127-182, 2007.



DEVICTOR, S.T.; MORTON, S.L. Identification guide to the shallow water (0-200 m) octocorals of the South Atlantic Bight. **Zootaxa**, v. 2599, p. 1-62, 2010.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303-336, 2012.

EPIFANIO, R.A.; MAIA, L.F.; PINTO, A.C.; HARDT, I.; FENICAL, W. Nature Products from the Gorgonian *Lophogorgia punicea*: Isolation and Structure Elucidation of an Unusual 17-hydroxy Sterol. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 2, p. 187-192, 1998.

EPIFANIO, R.A.; MAIA, L.F.; FENICAL, W. Chemical Defenses of the Endemic Brazilian Gorgonian *Lophogorgia violacea* Pallas (Octocorallia, Gorgonacea). **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 11, p. 584-591, 2000.

EUROPEAN COMMISSION. European Commission of Public Health. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/health/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/index_en.htm)> Acesso em 04/06/2014.

FAULKNER, D.J. Marine Natural products. **Natural Products Reports**, v.19, p. 1-48, 2002.

FENICAL, W.; OKUDA, R.K.; BANDURRAGA, M.M.; CULVER, P.; JACOBS, R.S. A Novel Neuromuscular Toxin from Pacific Sea Whips of the Genus *Lophogorgia*. **Science**, v.212, p.1512-1513, 1981.

GARAVENTA, F.; PIAZZA, V.; ZOVKO, A.; TURK, T.; CHELOSSI, E.; FALUGI, C.; ALUIGI, M.G.; ANGELINI, C.; TROMBINO, S.; GALLUS, L.; FERRANDO, S.; ALBINI, A.; PALEARI, L.; SEPCIC, K.; FAIMALI, M. Multiple functions of the cholinesterase inhibiting poly-alkylpyridinium salts extracted from the marine sponge, *Haliclona sarai*. **WSEAS Transactions on Biology and Biomedicine**, v. 7, p. 103-113, 2010.

GARRIDO L, ZUBIA E, ORTEGA MJ, SALVA J. Isolation and structure elucidation of new cytotoxic steroids from the gorgonian *Leptogorgia sarmentosa*. **Steroids**, v. 65, p. 85-88, 2000.

GRIMMELIKHUIJZEN, C.J.; WESTFALL, J.A. The nervous Systems of Cnidarians. **EXS**, v. 72, p. 7-24, 1995.

GUTIERREZ, M.; CAPSON, T.L.; GUZMAN, H.M.; GONZALEZ, J.; ORTEGA-BARRIA, E.; QUINOJA, E.; RIGUERA, R. Leptolide, a new

furanocembranolide diterpene from *Leptogorgia alba*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 614–616, 2005.

HATTORI, T.; ADACHI, K.; SHIZURI, Y. New ceramide from marine sponge *Haliclona koremella* and related compounds as antifouling substances against macroalgae. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 823–826, 1998.

OHTANI, I.; KUSUMI, T.; KASHMAN, Y.; KAKISAWA, H. High-Field FT NMR Application of Mosher's Method. The Absolute Configurations of Marine Terpenoids. **Journal of American Chemical Society**, v. 113, p. 4092–4096, 1991.

KAPPEL V.D.; COSTA G.M.; SCOLA G.; SILVA F.A.; LANDELL M.F.; VALENTE P.; SOUZA D.G.; VANZ D.C.; REGINATTO F.H.; MOREIRA J.C.F. Phenolic content and antioxidant and antimicrobial properties of fruits of *Capsicum baccatum* L. var. pendulum at different maturity stages. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 267–274, 2008.

KASAL, A.; BUDESINSKI, M. GRIFFITHS, W.J. Spectroscopic Methods of Steroid Analysis. In.: MAKIN, H.L.J.; GOWER, D.B.(Eds.) **Steroid analysis**. London: Springer, 2010. 102p.

KEYZERS, R.A.; GRAY, C.A.; SCHLEYER, M.H.; WHIBLEY, C.E.; HENDRICKS, D.T.; DAVIES-COLEMAN, M.T. Malonganenones A-C, novel tetraprenylated alkaloids from the Mozambique gorgonian *Leptogorgia gilchristi*. **Tetrahedron**, v. 62, p. 2200–2206, 2006.

KSEBATI, M.B.; CIERESZKO, L.S.; SCHMITZ, F.J. 11 $\beta$ ,12  $\beta$ -Epoxypukalide, a furanocembranolide from the gorgonian *Leptogorgia setacea*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 6, p. 1009–1012, 1984.

LEAL, M.C., MADEIRA, C., BRANDAO, C.A., PUGA, J., CALADO, R. Bioprospecting of marine invertebrates for new natural products – A chemical and zoogeographical perspective. **Molecules**, v. 17, p. 9842–9854, 2012.

LI, R.; SHAO, C.; QI, X.; LI, X.; LI, J.; SUN, L.; WANG, C. Polyoxygenated Sterols from the South China Sea Soft Coral *Sinularia* sp. **Marine Drugs**, v. 10, p. 1422–1432, 2012.

LIMNA, M.; RAVEENDRAN, T.V.; PARAMESWARAN, P.S. Antifouling activity by secondary metabolites of the marine sponge, *Haliclona exigua* (Kirkpatrick). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 67–72, 2009.

LINDNER, A. (Org.). Vida Marinha de Santa Catarina. Florianópolis: UFSC, 2014. 31p.

LOOK, S.A.; FENICAL, W.; JACOBS, R.S.; CLARDY, J. The pseudopterosins: Anti-inflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 83, p. 6238-6240, 1986.

MANI, L.; PETEK, S.; VALENTIN, A.; CHEVALLEY, S.; FOLCHER, E.; AALBERSBERG, W.; DEBITUS, C. The in vivo anti-plasmodial activity of haliclونacyclamine A, an alkaloid from the marine sponge, *Haliclona* sp. **Natural Products Research**, v. 25, p. 1923–1930, 2011.

MAIER, M.S.; ROCCATAGLIATA, A.; SELDES, A.M. Two Novel Steroidal Glycoside Sulfates from the starfish *Cosmasterias lurida*. *Journal of Natural Products*, v. 56, p. 939-942, 1993.

MAYER, A.M.S; GLASER, K.B.; CUEVAS, C.; JACOBS, R.S.; KEM, W.; LITTLE, D.; MCINTOSH, J.M.; NEWMAN, D.J.; NEWMAN, D.J.; POTTS, B.C.; SHUSTER, D.E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, p. 255-265, 2010.

MCFADDEN, C.S.; SÁNCHEZ, J.A.; FRANCE, S.C. Molecular Phylogenetic Insights into the Evolution of Octocorallia: A Review. **Integrative and Comparative Biology**, v. 50, p. 389-410, 2010.

MILOSLAVICH, P.; KLEIN, E.; DÍAZ, J.M.; HERNÁNDEZ, C.E.; BIGATTI, G.; CAMPOS, L.; ARTIGAS, F.; CASTILLO, J.; PENCHASZADEH, P.E.; NEILL, P.E.; CARRANZA, A.; RETANA, M.V.; ASTARLOA, J.M.D.; LEWIS, M.; YORIO, P.; PIRIZ, M.L.; RODRÍGUEZ, D.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; GAMBOA, L.; MARTÍN, A. Marine Biodiversity in the Atlantic and Pacific Coasts of South America: Knowledge and Gaps. **PlosOne**. v. 6, n.1, p.1-64, 2011.

MIRALLES, J.; BARNATHAN, G.; GALONNIER, R.; SALL, T.; SAMB, A.; GAYDOU, E.M.; KORNPROBST, J.M. New branched-chain fatty acids from the Senegalese gorgonian *Leptogorgia piccola* (white and yellow morphs). **Lipids**, v. 30, n. 5, p. 459-466, 1995.

MOLDOWAN, J.M.; TAN, W.L.; DJERASSI, C. 24ε-Methylcholestane-3β, 5α, 6 β, 25-Pentol 25-monoacetate, a novel polyoxygenated marine sterol. **Steroids**, v. 26, n.1, 1975.

MOLINSKI, T. F.; DALISAY, D. S.; LIEVENS, S. L.; SALUDES, J. P. Drug development from marine natural products. **Nature Reviews**. v.8, p. 69-85, 2009.

MURATORE, M.E.; SHI, L.; PILLING, A.W.; STORERC, I.; DIXON, D.J. Exploiting a novel size exclusion phenomenon for enantioselective acid/base cascade catalysis. **Chemical Communications**. v. 48, p. 6351-6353, 2012.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Advanced Preclinical and Clinical Trials of Natural Products and Related Compounds from Marine Sources. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1693-1713, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1982 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

OFWEGEN, L.P. VAN, HADDAD, M.A. A probably invasive new genus and new species of soft coral (Octocorallia: Alcyonacea: Clavulariidae) from Brazil. **Zootaxa**, v. 3107, p. 38-46, 2011.

OLIVEIRA, S.Q.; TRENTIN, V.H.; KAPPEL, V.D.; BARELLI, C.; GOSMANN, G.; REGINATTO, F.H. Screening of antibacterial activity of South Brazilian *Baccharis* species. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, p.434-438, 2005.

ORTEGA, M.J.; ZUBIA, E.; SANCHEZ, M.C.; CARBALLO, J.L. Cembrane Diterpenes from the Gorgonian *Leptogorgia laxa*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p.1637-1639, 2008.

PALERMO, J.A.; BRASCO, M.F.R.; SELDES, A.M. Storniamides A-D: Alkaloids from a Patagonian Sponge *Cliona* sp. *Tetrahedron*, v. 52, p. 2727-2734, 1996.

PALERMO, J.A.; BRASCO, M.F.R.; CABEZAS, E.; BALZARETTI, V.; SELDES, A.M. Celenamide E, a Tripeptide Alkaloid from the Patagonian Sponge *Cliona chilensis*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 488-490, 1998.

PALERMO, J.A.; Productos Naturales Marinos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Florianópolis: Editora da UFSC, Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003.

PARAMESWARAN, P.S.; KAMAT, S.Y.; CHANDRAMOHAN, D.; NAIR, S.; DAS, B. Anti-bacterial compounds from the sponge *Haliclona* sp. **Oceanography of the Indian Ocean**, p. 417–20, 1992.

PARAMESWARAN, P.S.; NAIK, C.G.; KAMAT, S.Y. Renieramycins H and I, two novel alkaloids from the sponge *Haliclona cribricutis* Dendy. **Indian Journal of Chemistry**, v. 37B, p.1258-1263, 1998.

PÉREZ, D. Primeiro registro de *Leptogorgia punicea* (Milne-Edwards & Haime) (Cnidaria, Octocorallia) para o Estado do Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22, p.810–811, 2005.

PÉREZ, C.D., NEVES, B.M, OLIVEIRA, D.H.R. New records of octocorals (Cnidaria: Anthozoa) from the Brazilian coast. **Aquatic Biology**, v.13, p. 203-214, 2011.

PETTIT, G.R.; INOUE, M.; KAMANO, Y.; HERALD, D.L.; ARM, C.; DUFRESNE, C.; CHRISTIE, N.D.; SCHMIDT, J.M.; DOUBEK, D.L.; KRUPA, T.S. Isolation and Structure of the Powerful Cell Growth Inhibitor Cephalostatin 1. **Journal of American Chemical Society**, v. 110, p. 2006-2007, 1988.

PRAWAT, H., MAHIDOL, C.; KAWETRIPOB, W.; WITTAYALAI, S.; RUCHIRAWAT, S. Iodoesquiterpene hydroquinone and brominated indole alkaloids from the Thai sponge *Smenospongia* sp. **Tetrahedron**, v. 68, p. 6881-6886, 2012.

PRETSCH, E.; CLERC, T.; SEIBL, J.; SIMON, W. Spectral data for structure determination of organic compounds. Berlin: Springer, 1989. 211p.

RASHID, M.A.; GUSTAFSON, K.R.; BOYD, M.R. A new isoquinoline alkaloid from the marine sponge *Haliclona* species. **Journal of Natural Products**, v. 64: p. 1249–1250, 2001.

ROCCATAGLIATA, A.J.; MAIER, M.S.; SELDES, A.M. A novel marine steroidal sulfate from the starfish *Luidia ludwigi*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 1941-1944, 1995.

ROCHA, J.; PEIXE, L.; GOMES, N.C.M.; CALADO, R. Cnidarians as a Source of New Marine Bioactive Compounds - An Overview of the Last Decade and Future Steps for Bioprospecting. **Marine Drugs**, v.9, p. 1860-1886, 2011.

RODRÍGUEZ, W.; OSORNO, O.; RAMOS, F.A.; DUQUE, C.; ZEA, S. New fatty acids from Colombian Caribbean Sea sponges. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 774-783, 2010.

ROUSSIS, V.; FENICAL, W.; MIRALLES, J.; KORNPORST, J.M. Piccolamine, an unusual N,N-dimethylaminomethylfuranosquiterpene and related terpenoids from the gorgonian *Leptogorgia piccola*. **New Journal of Chemistry**, v. 15, n. 12, p. 959-961, 1991.

SAGAR, S.; KAUR, M.; MINNEMAN, K.P. Antiviral Lead Compounds from Marine Sponges. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2619-2638, 2010.

SALVADOR, J.A.R.; CARVALHO, J.F.S.; NEVES, M.A.; SILVESTRE, S.M.; LEITÃO, A.J.; SILVA, M.C.; SÁ E MELO, L. Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds. **Natural Product Reports**, v. 30, p. 324-374, 2013.

SANTALOVA, E.A.; MAKARIEVA, T.N.; PONOMARENKO, L.P.; DENISENKO, V.A.; KRASOKHIN, V.B.; MOLLO, E.; CIMINO, G.; STONIK, V.A. Sterols and related metabolites from five species of sponges. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 439-446, 2007.

SARMA, N.S.; KRISHNA, M.S.; PASHA, S.G.; RAO, T.S.P.; VENKATESWARLU, Y.; PARAMESWARAN, P.S. Marine Metabolites: The Sterols of Soft Coral. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 2803-2828, 2009.

STONIK, V.A. Marine polar steroids. **Russian Chemical Reviews**, v. 70, p. 673-715, 2001.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Florianópolis: Editora da UFSC, Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003.

SHAPO, J.L.; MOELLER, P.D.; GALLOWAY, S.B. Antimicrobial activity in the common seawhip, *Leptogorgia virgulata* (Cnidaria: Gorgonaceae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.148, p. 65-73, 2007.

TARGETT, N.M.; BISHOP, S.S.; MCCONNELL, O.J.; YODER, J.A. Antifouling agents against the benthic marine diatom, *Navicula salinicola*: homarine from the gorgonians *Leptogorgia virgulata* and *L. setacea* and analogs. **Journal of Chemical Ecology**, v.9, p. 817-829, 1983.

TSENG, Y.J.; SHEN, K.P.; LIN, H.L.; HUANG, C.Y.; DAI, C.F.; SHEU, J.H. Lochmolins A-G, New Sesquiterpenoids from the Soft Coral *Sinularia lochmodes*. **Marine Drugs**, v. 10, p. 1572-1581, 2012.

WATTANADILOK, R.; SAWANGWONG, P.; RODRIGUES, C.; CIDADE, H.; PINTO, M.; PINTO, E.; SILVA, A.; KIJJOA, A. Antifungal activity evaluation of the constituents of *Haliclona baeri* and *Haliclona cymaeformis*, collected from the Gulf of Thailand. **Marine Drugs**, v. 5, p. 40-51, 2007.

WANG, C.; YANG, Y.; MEI, Z.; YANG, X. Cytotoxic compounds from *Laminaria japonica*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 49, 2013.

WEINHEIMER, A.J.; SPRAGGINS, R.L. The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA2 and its acetate, methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla*. **Tetrahedron Letters**, v. 2, p.5185-5188, 1969.

WRATTEN, S.J.; FAULKNER, J. Metabolites of the Red Alga *Laurencia subopposita*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 21, 3343-3349, 1977.

YU, S.; DENG, Z.; PROKSCH, P.; LIN, W. Oculatol, oculatolide, and A-nor sterols from the sponge *Haliclona oculata*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1330-1334, 2006.

ZHOU, G.; MOLINSKI, T. Long-chain acetylenic ketones from the Micronesian sponge *Haliclona* sp. Importance of the 1-yn-3-ol group for antitumor activity. **Marine Drugs**, v. 1, p. 46-53, 2003.

ZULETA, I.A.; VITELLI, M.L.; BAGGIO, R.; GARLAND, M.T.; SELDES, A.M.; PALERMO, J.A. Novel pteridine alkaloids from the sponge *Clathria* sp. **Tetrahedron**, v. 58, p. 4481-4486, 2002.

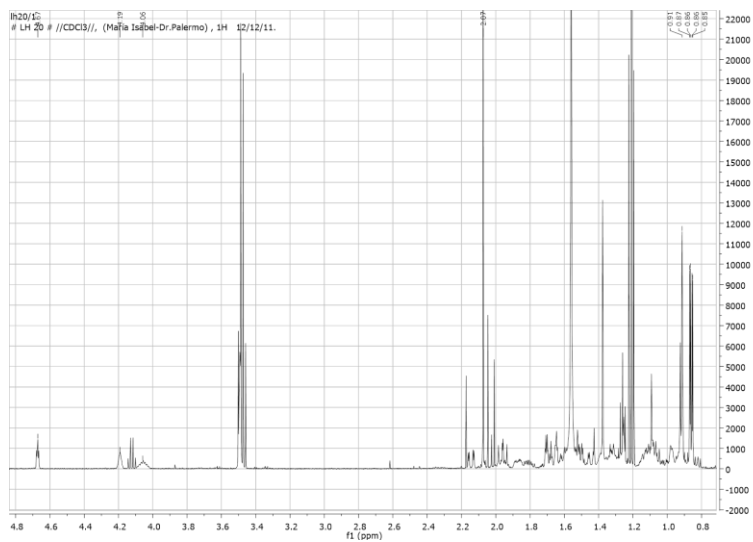




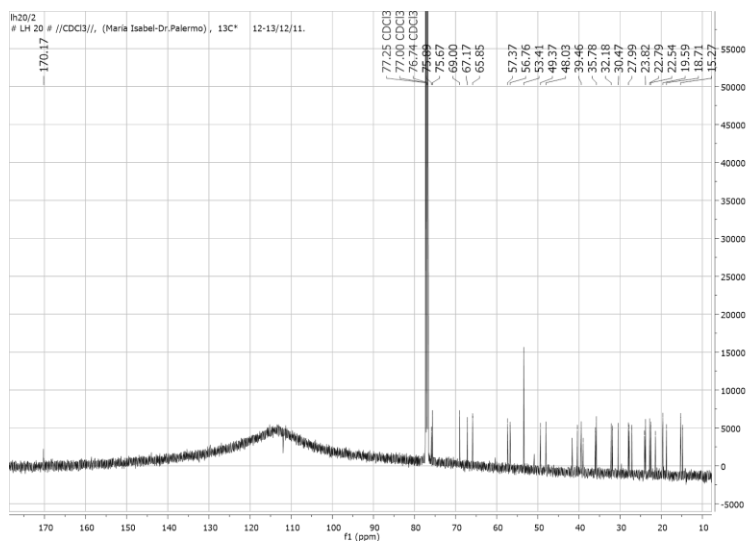




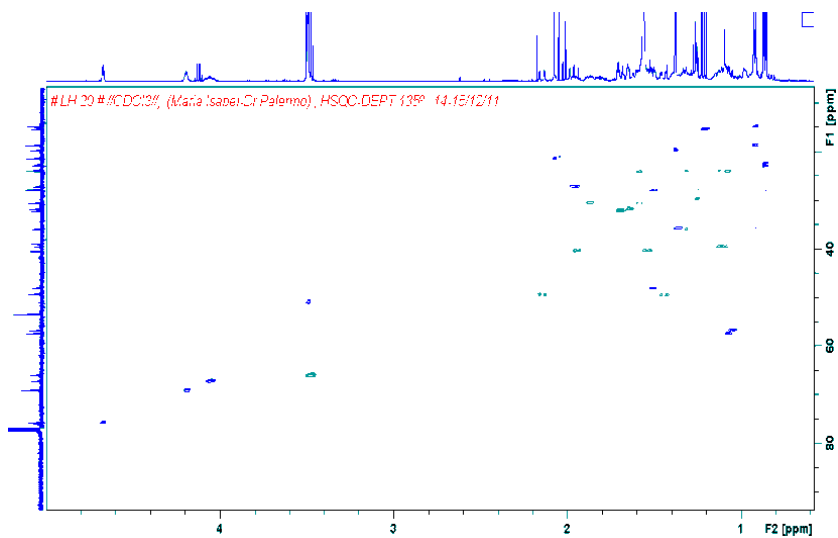
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância F3 em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).



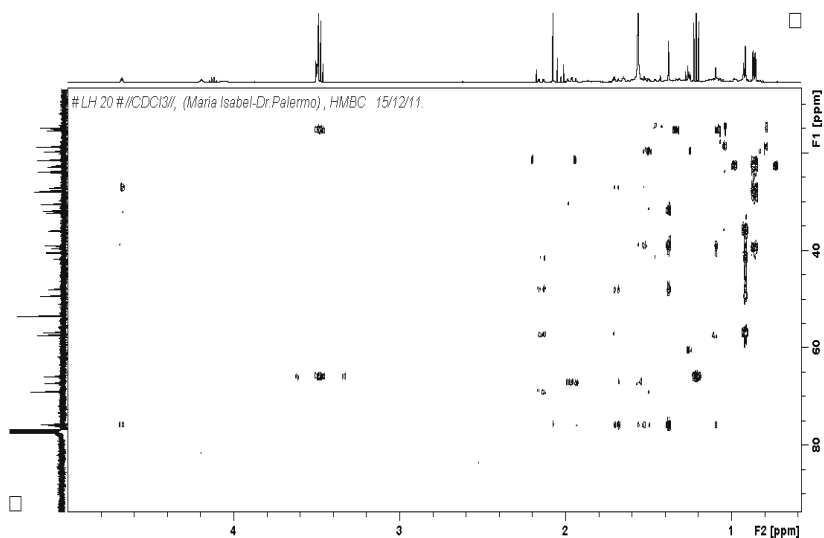
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância F3 em  $\text{CDCl}_3$  (125 MHz).



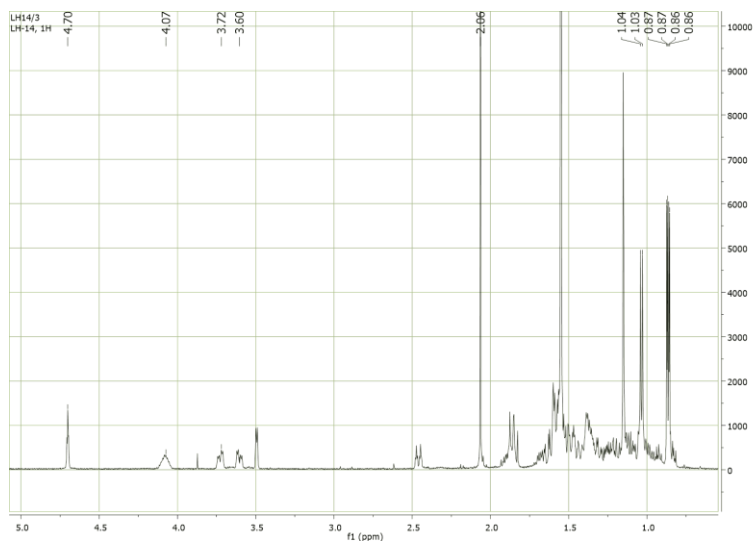
Espectro de HSQC/DEPT da substância F3 em  $\text{CDCl}_3$  (125/500MHz).



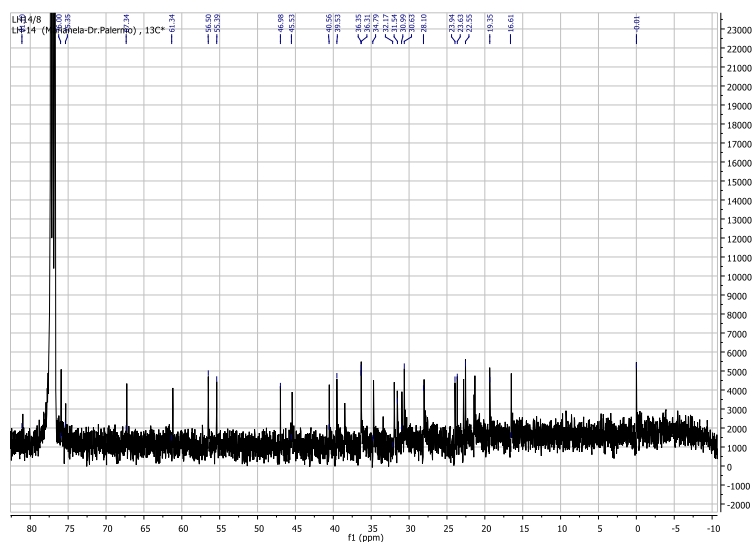
Espectro de HMBC da substância F3 em  $\text{CDCl}_3$  (125/500 MHz).

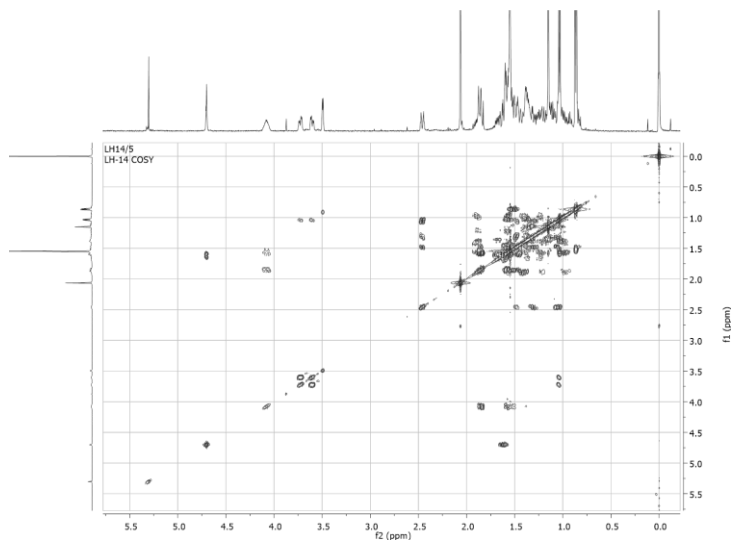
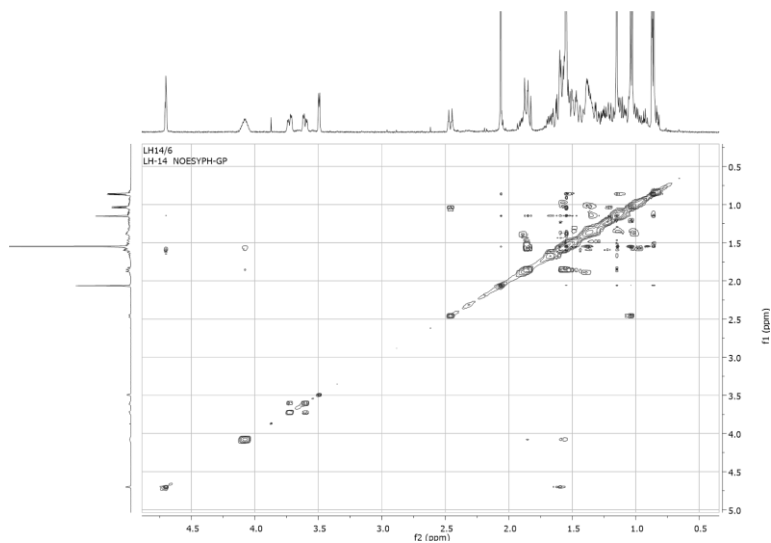


Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância F4 em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

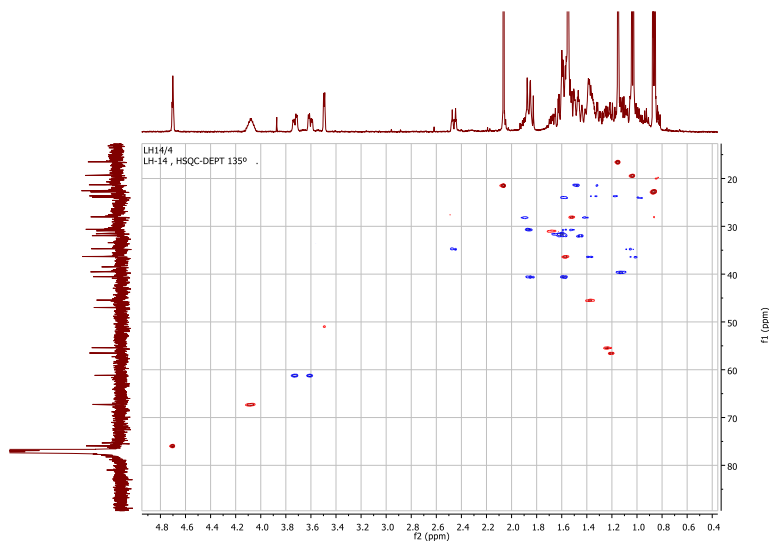


Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância F4 em  $\text{CDCl}_3$  (125 MHz).

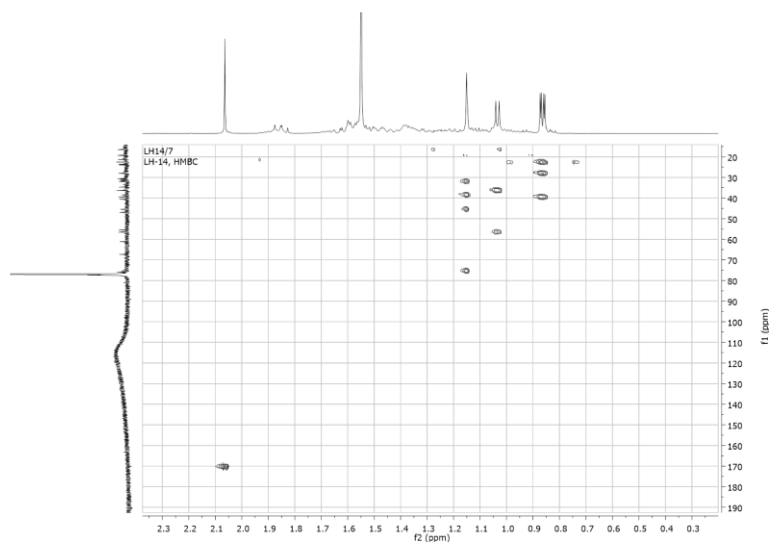


Espectro de COSY da substância F4 em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).Espectro de NOESY da substância F4 em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

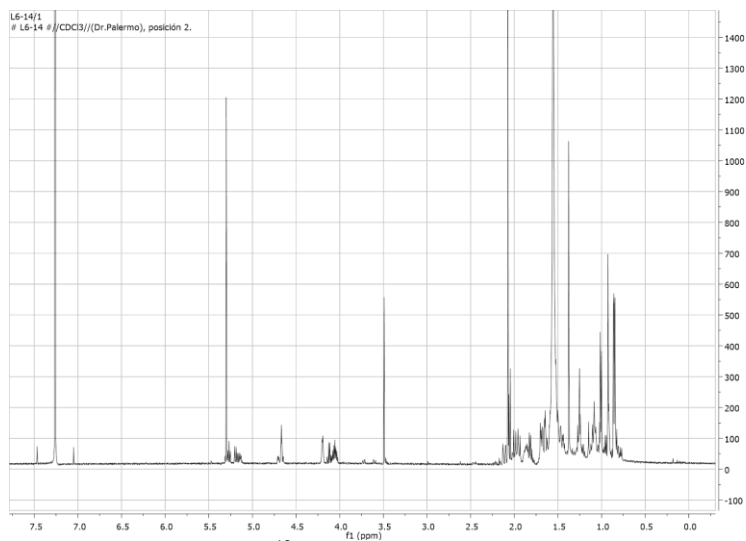
Espectro de HSQC/DEPT da substância F4 em  $\text{CDCl}_3$  (125/500 MHz).



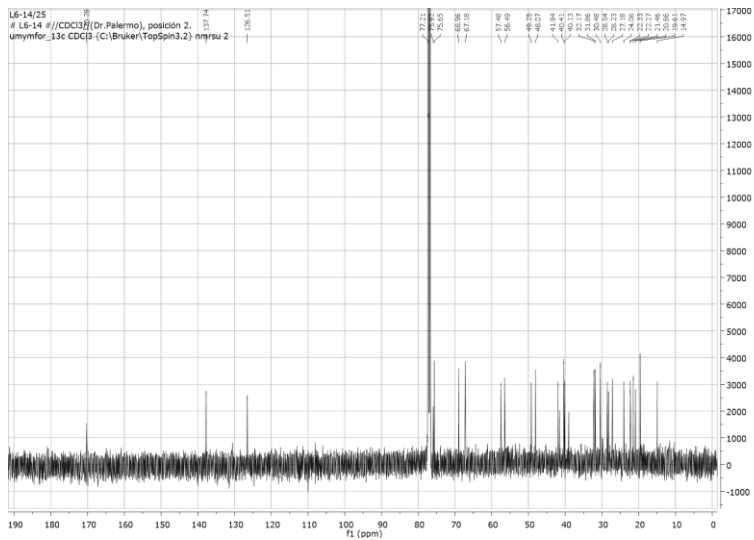
Espectro de HMBC da substância F4 em  $\text{CDCl}_3$



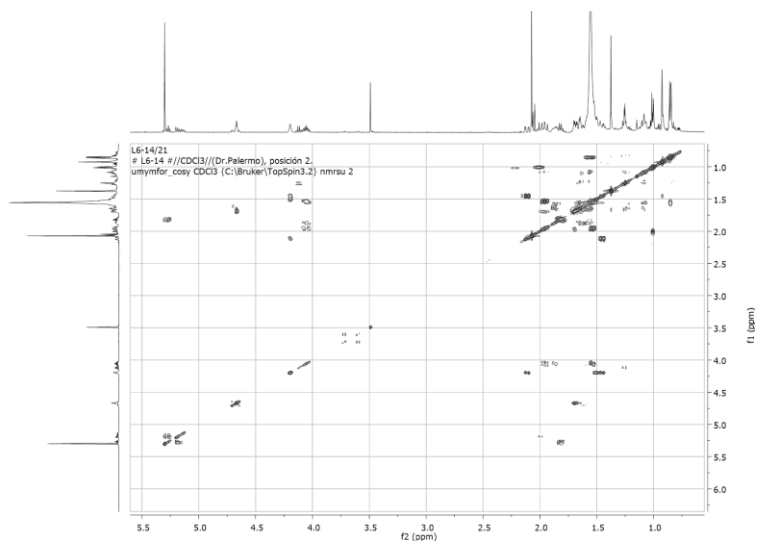
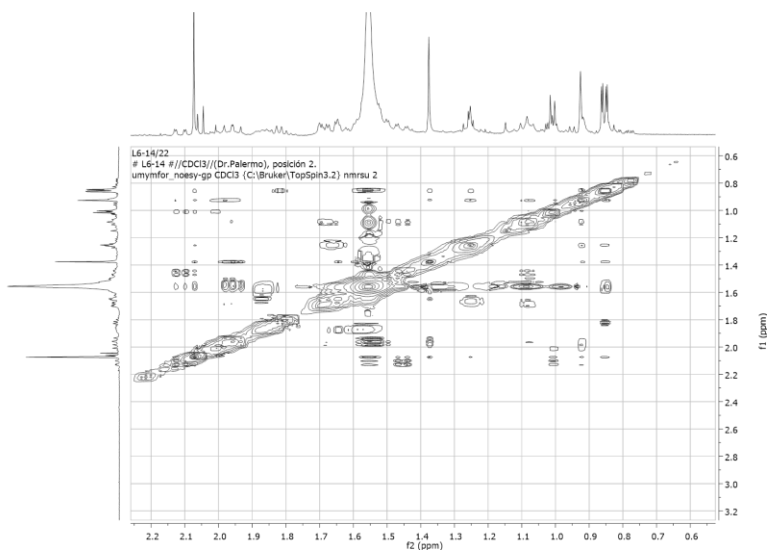
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância F5 em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).



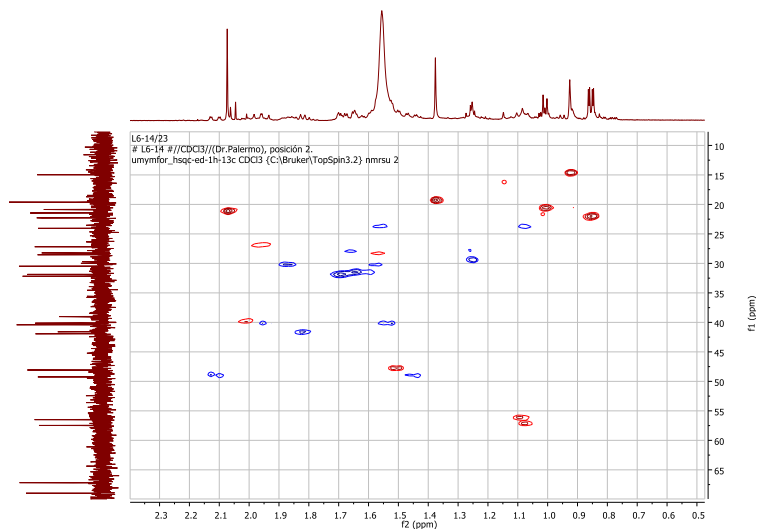
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância F5 em  $\text{CDCl}_3$  (125 MHz).



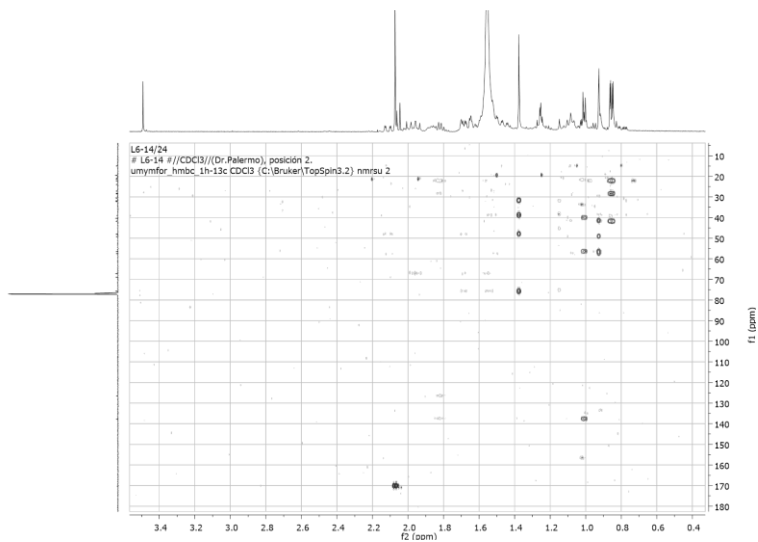


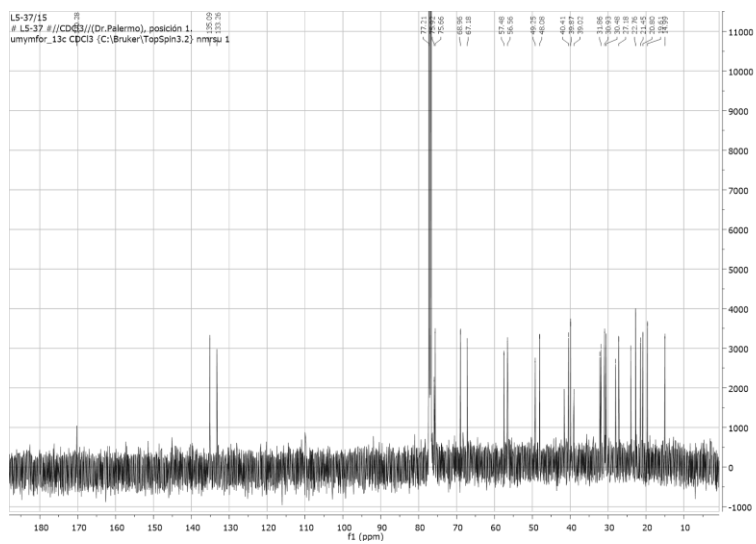
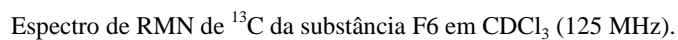
Espectro de COSY da substância F5 em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).Espectro de NOESY da substância F5 em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

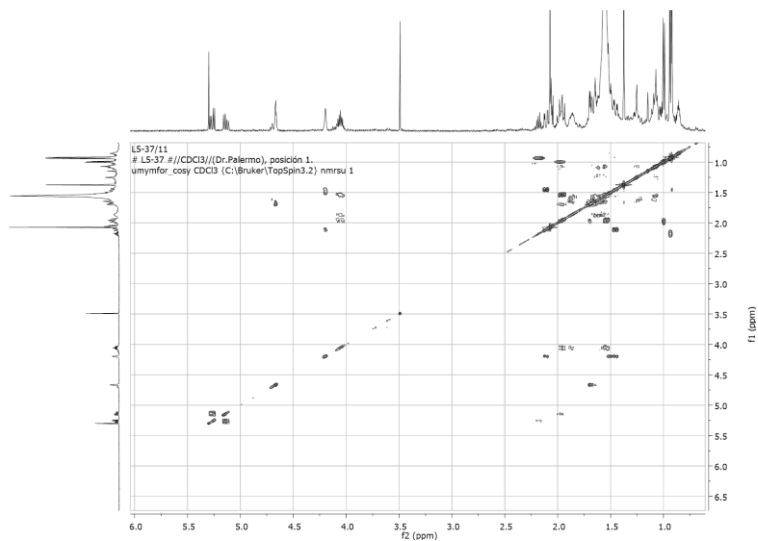
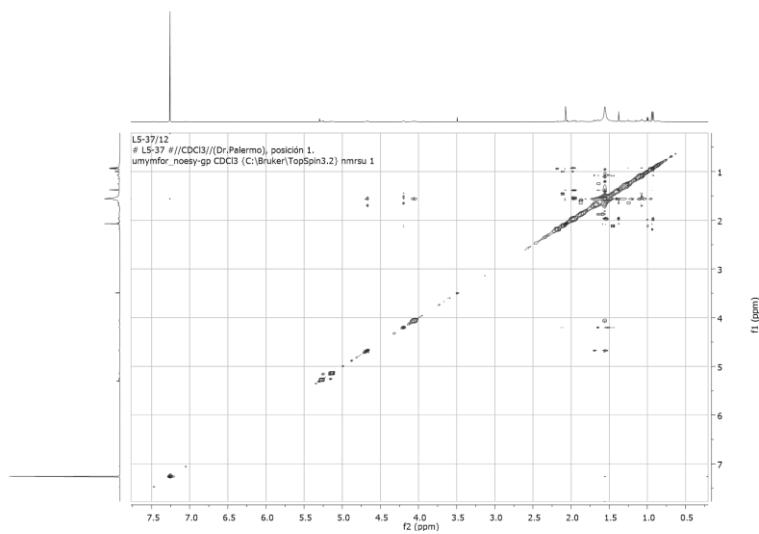
Espectro de HSQC/DEPT da substância F5 em  $\text{CDCl}_3$  (125/500 MHz).



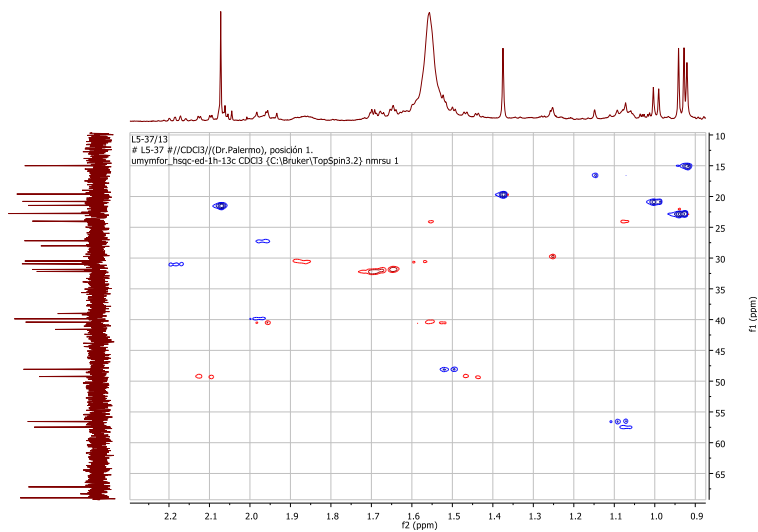
Espectro de HMBC da substância F5 em  $\text{CDCl}_3$ .



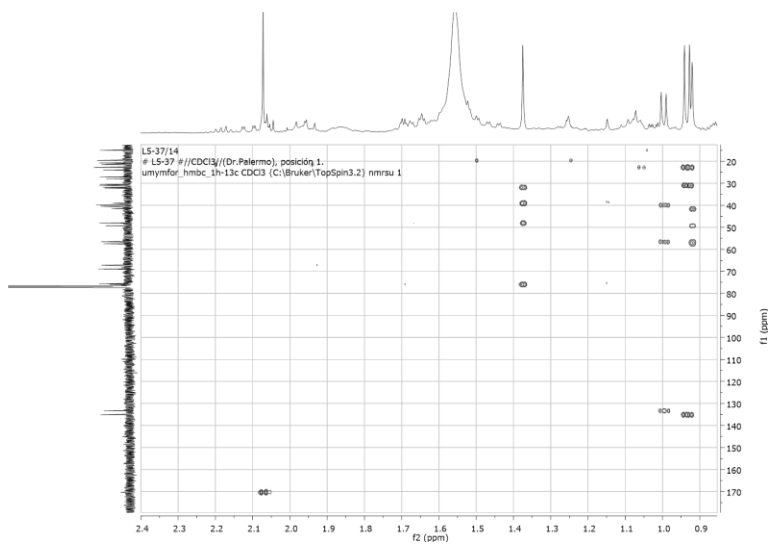


Espectro de COSY da substância F6 em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).Espectro de NOESY da substância F6 em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

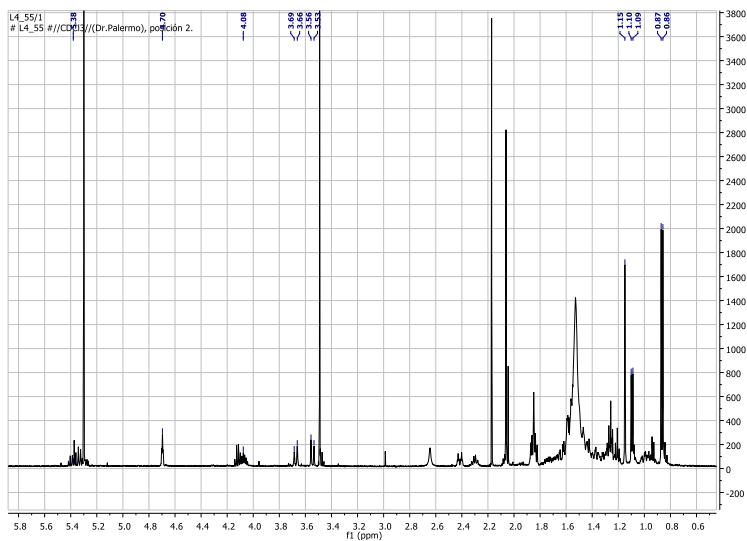
Espectro de HSQC/DEPT da substância F6 em  $\text{CDCl}_3$  (125/500 MHz).



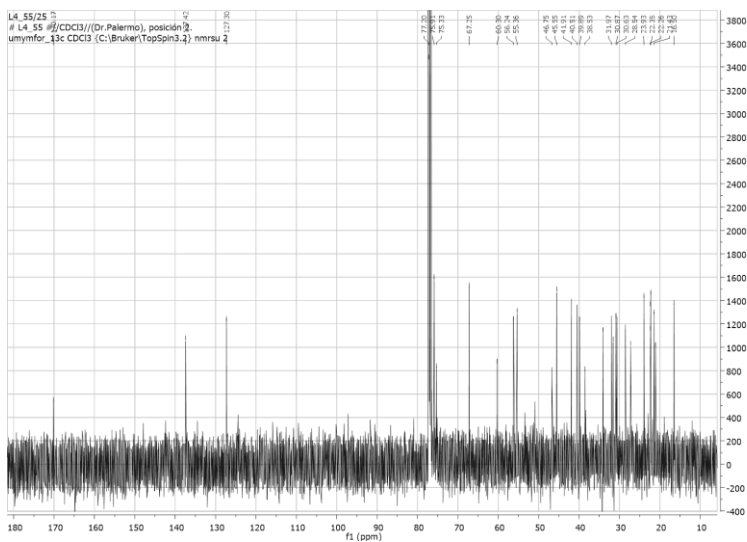
Espectro de HMBC da substância F6 em  $\text{CDCl}_3$ .

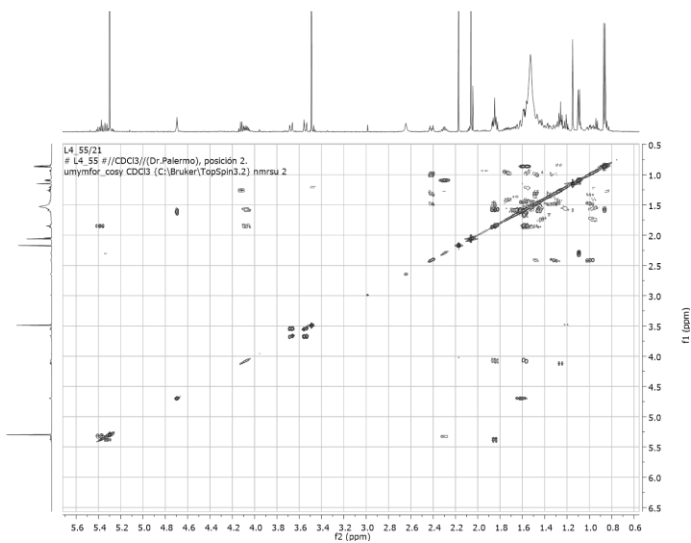
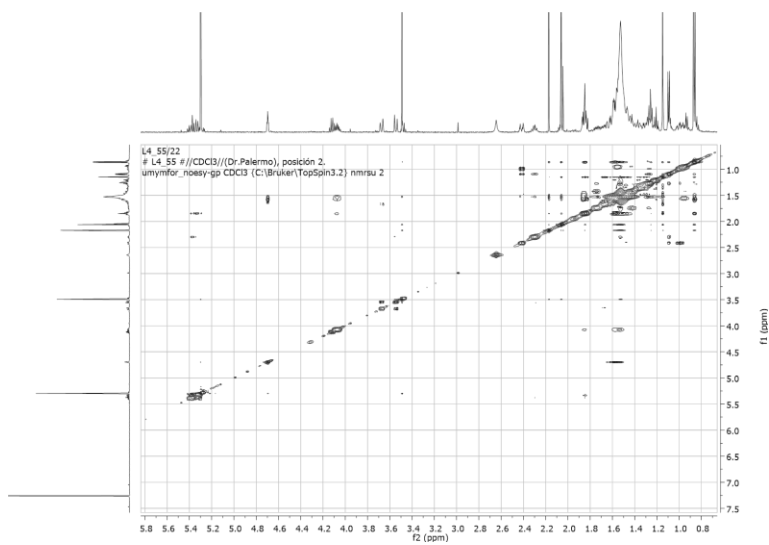


Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância F6 em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

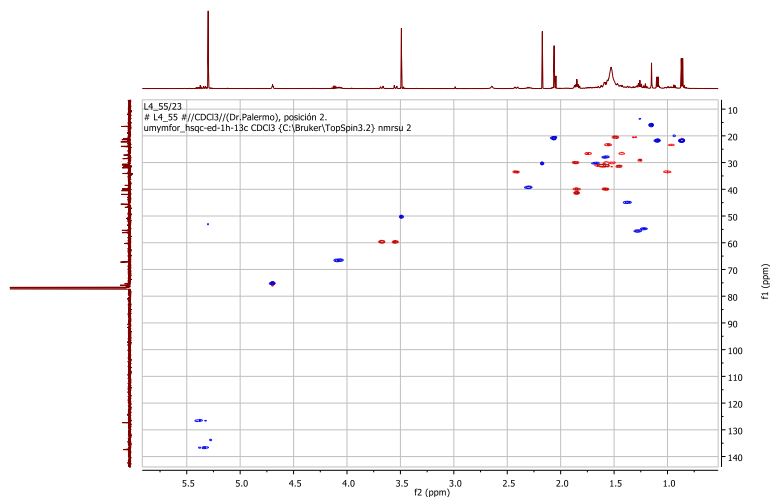


Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância F7 em  $\text{CDCl}_3$  (125 MHz).

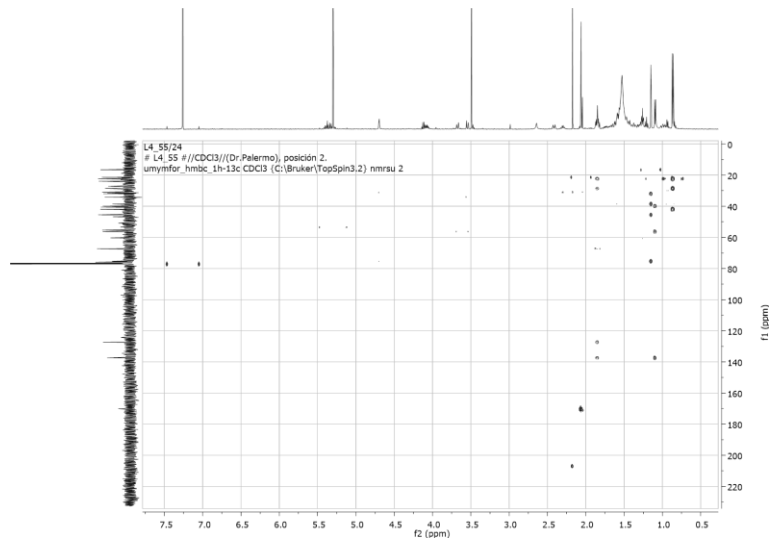


Espectro de COSY da substância F7 em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).Espectro de NOESY da substância F7 em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

Espectro de HSQC/DEPT da substância F7 em  $\text{CDCl}_3$  (125/500 MHz).

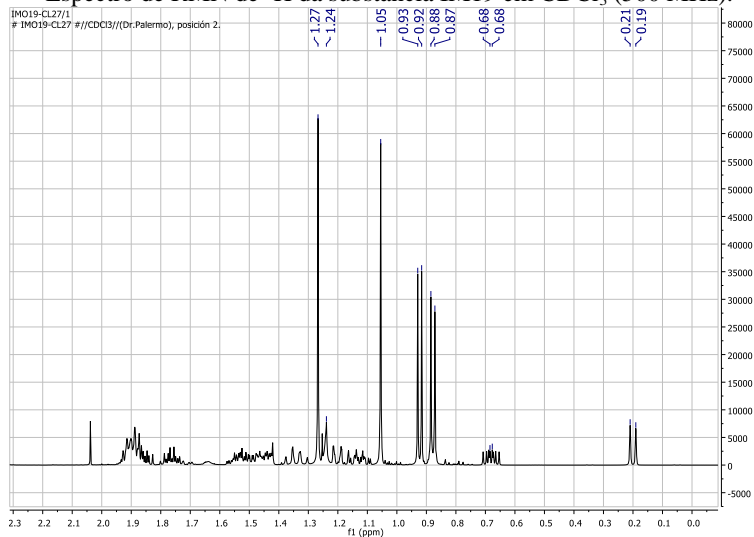


Espectro de HMBC da substância F7 em  $\text{CDCl}_3$  (125/500 MHz).

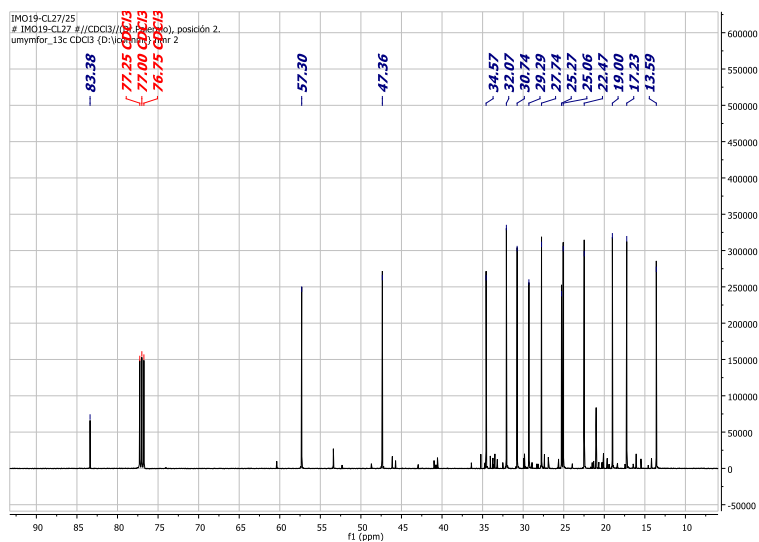


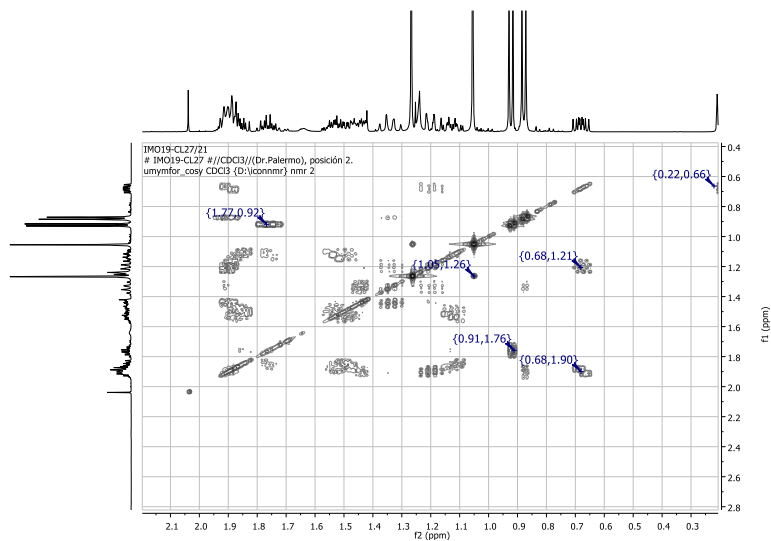
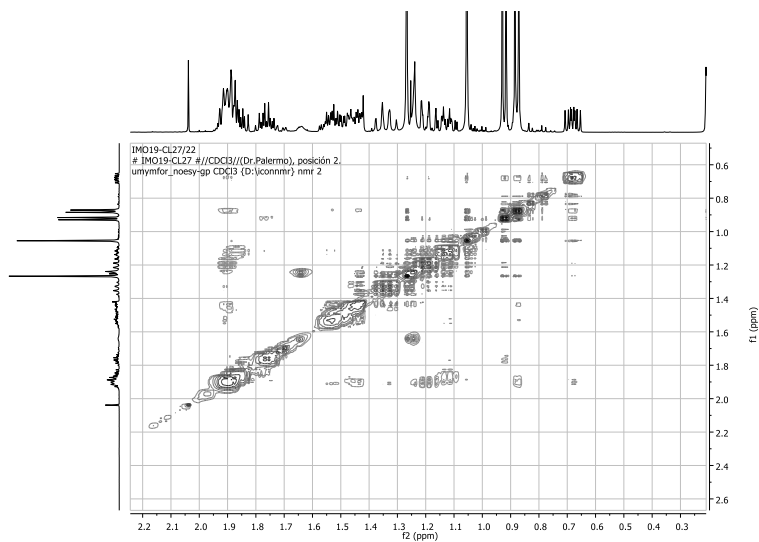


Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância IM19 em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

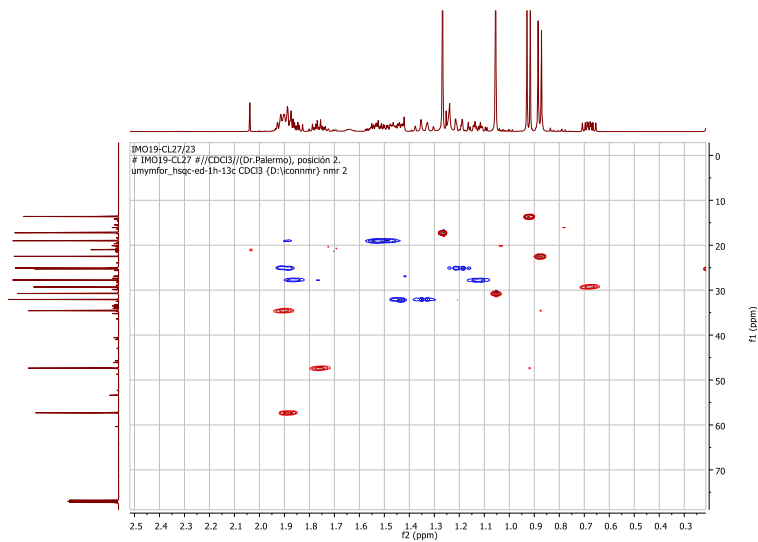


Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância IM19 em  $\text{CDCl}_3$  (125 MHz).

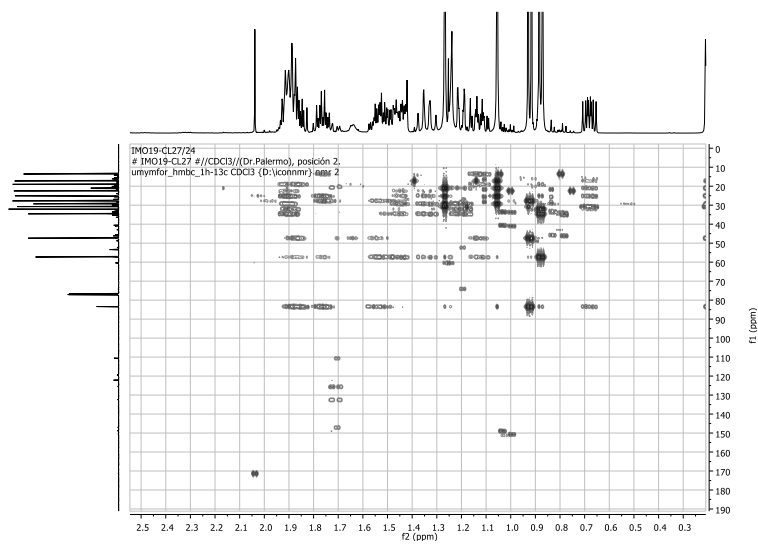


Espectro de COSY da substância IM19 em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).Espectro de NOESY da substância IM19 em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

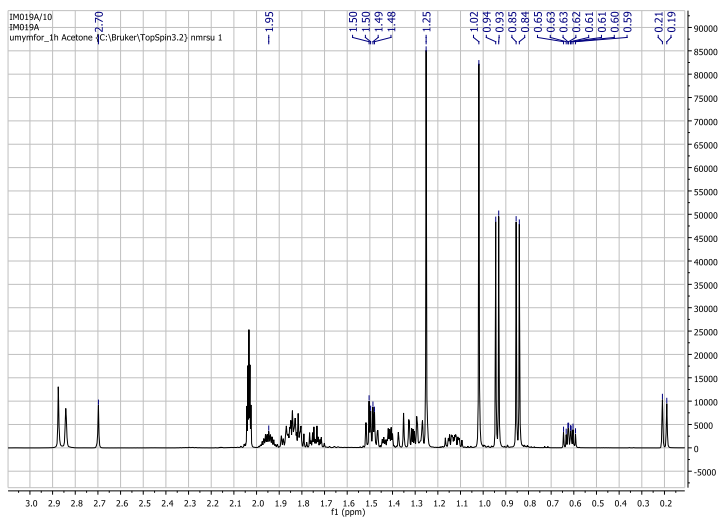
Espectro de HSQC/DEPT da substância IM19 em  $\text{CDCl}_3$  (125/500 MHz).



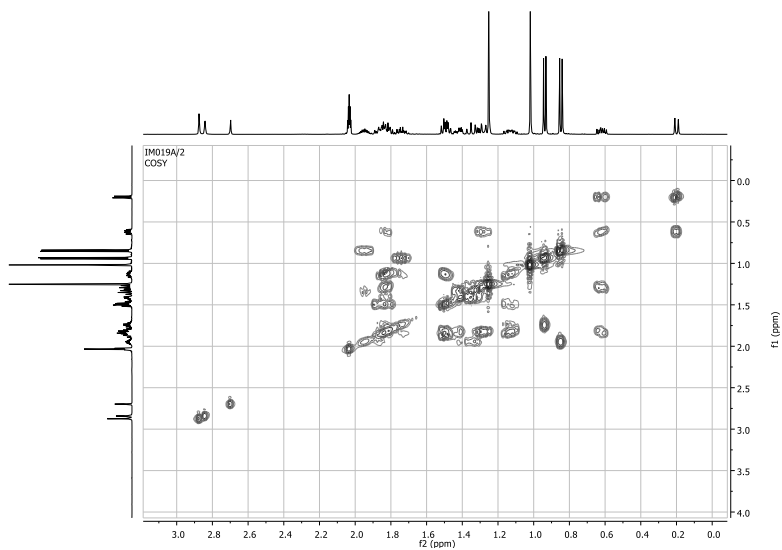
Espectro de HMBC da substância IM19 em  $\text{CDCl}_3$  (125/500 MHz).

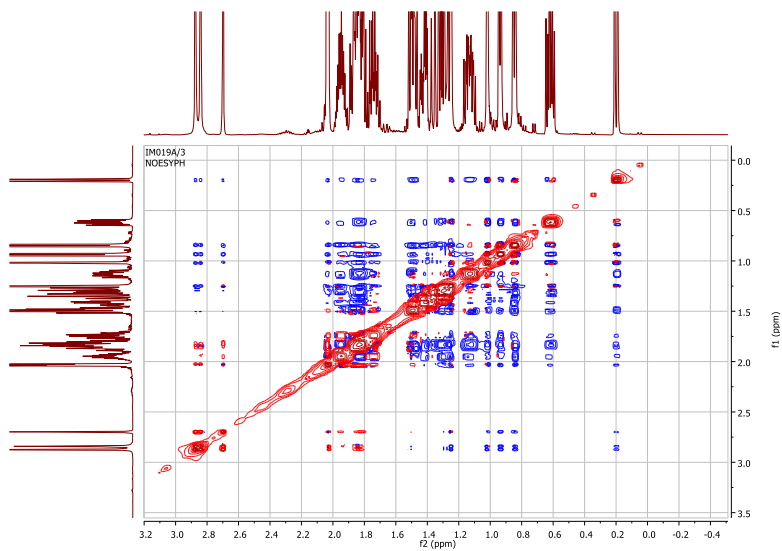
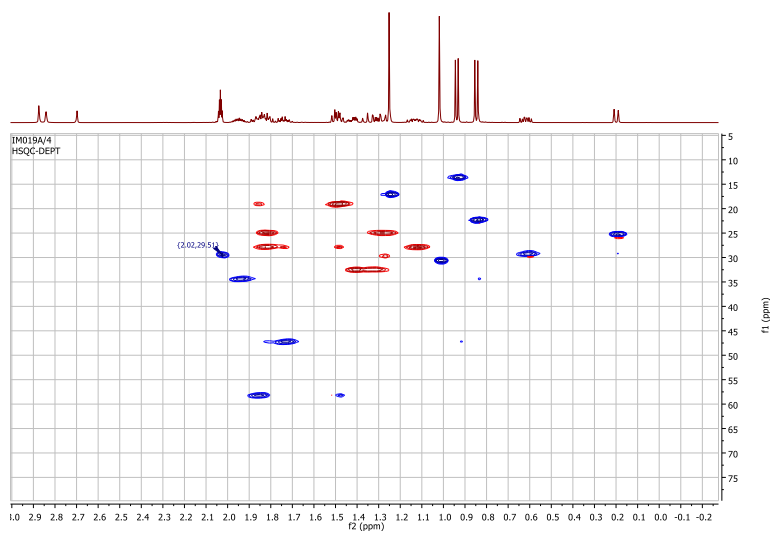


Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância IM19 em Acetona- $\text{d}_6$  (500 MHz).

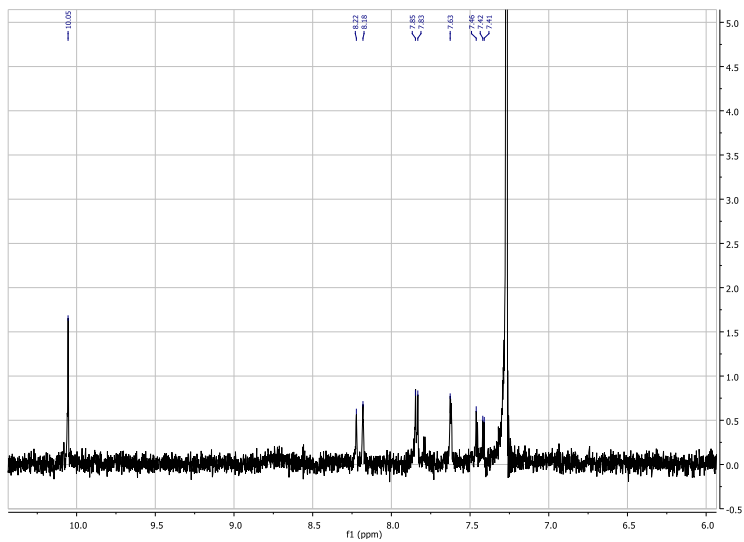


Espectro de COSY da substância IM19 em Acetona- $\text{d}_6$  (500 MHz).

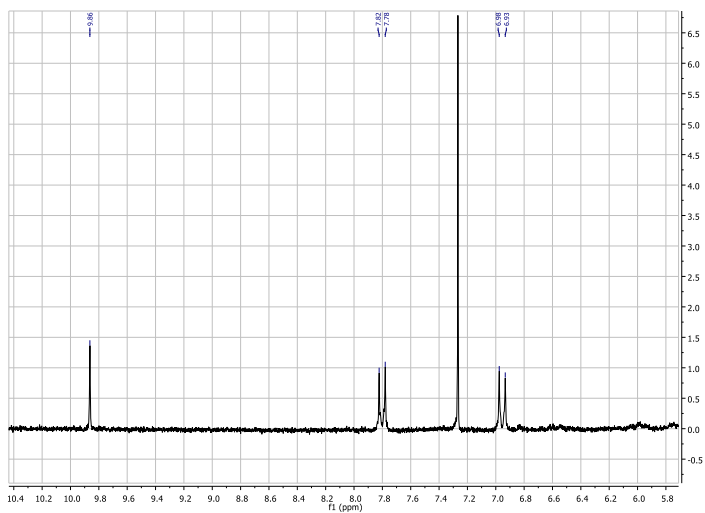


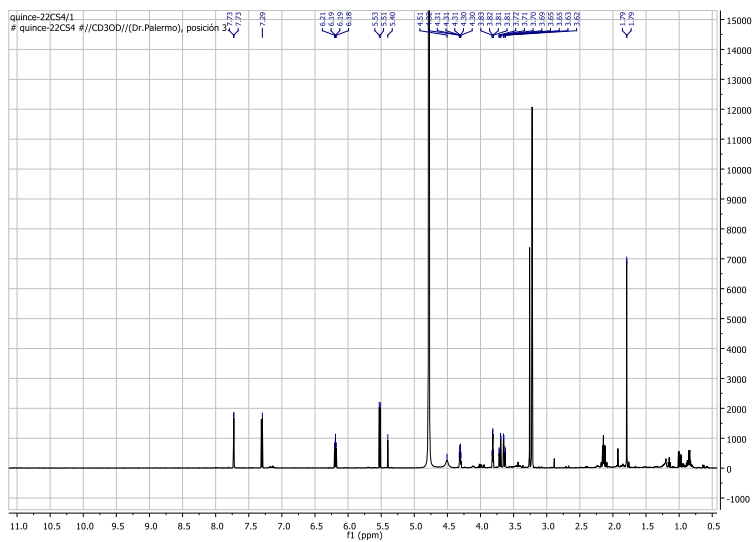
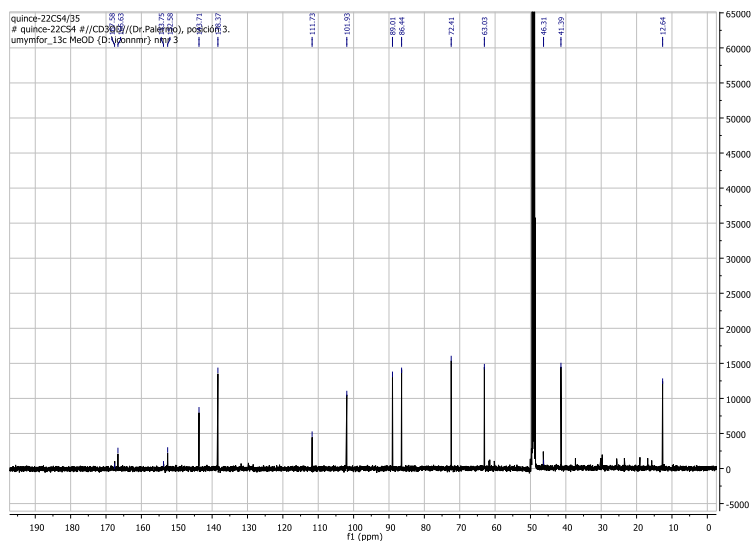
Espectro de NOESY da substância IM19 em Acetona- $d_6$  (500 MHz).Espectro de HSQC/DEPT da substância IM19 em Acetona- $d_6$  (125/500 MHz).

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância IBC1 em  $\text{CDCl}_3$  (200 MHz).

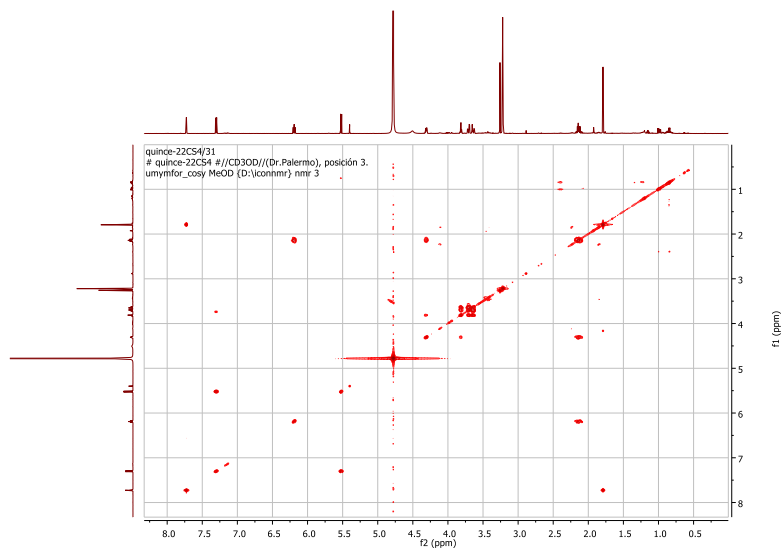


Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância EGC1 em  $\text{CDCl}_3$  (200 MHz).

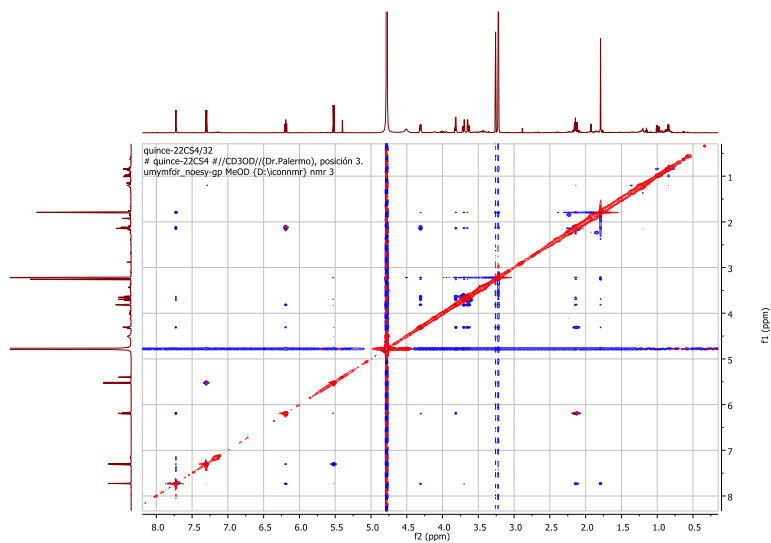


Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância EGC2 em MeOD (500 MHz).Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância EGC2 em MeOD (125 MHz).

Espectro de COSY da substância ECG2 em MeOD (500 MHz).

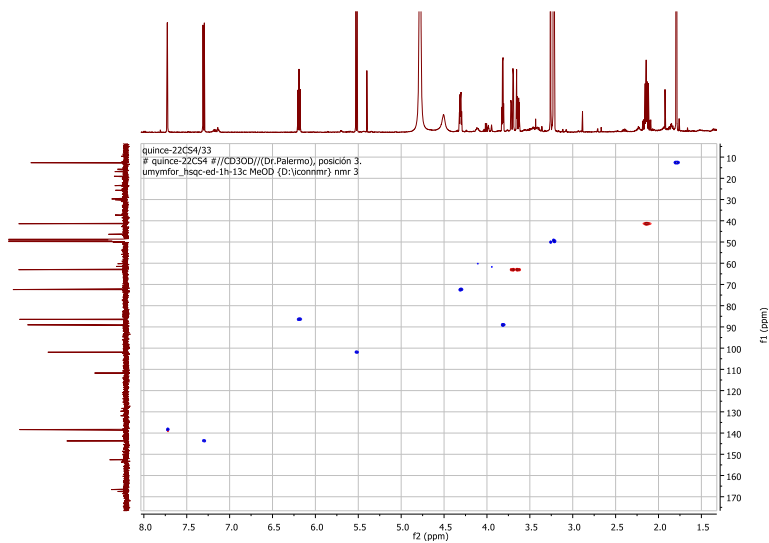


Espectro de NOESY da substância ECG2 em MeOD (500 MHz).

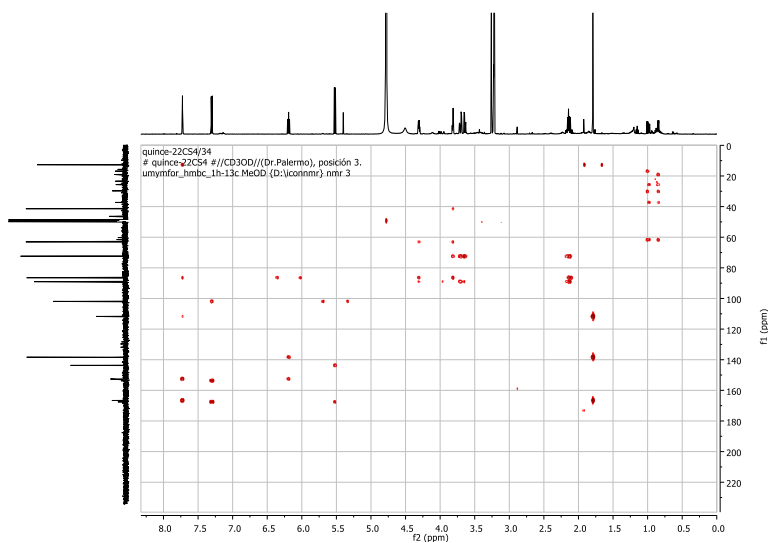




Espectro de HSQC/DEPT da substância ECG2 em MeOD (500 MHz).



Espectro de HMBC da substância ECG2 em MeOD (500 MHz).





## APÊNDICE 2 – TRABALHOS PUBLICADOS



## ARTIGOS PUBLICADOS

1- BIANCO, E.M.; OLIVEIRA, S.Q.; RIGOTTO, C.; TONINI, M.L.; GUIMARÃES, T.R.; BITTENCOURT, F.; GOUVEA, L.P.; ARESI, C.; ALMEIDA, M.T.R.; MORITZ, M.I.G.; MARTINS, C.D.L.; SCHERNER, F.; CARRARO, J.L.; HORTA, P.A.; REGINATTO, F.H. STEINDEL, M.; SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. Anti-Infective Potential of Marine Invertebrates and Seaweeds from the Brazilian Coast. **Molecules**, v. 18, p. 5761-5778, 2013.

2- ALMEIDA, M.T.R.; MORITZ, M.I.G.; CAPEL, K.C.C.; PÉREZ, C.D. Chemical and biological aspects of octocorals from the Brazilian coast. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 446-467, 2014.

3- MORITZ, M.I.G.; MAROSTICA, L.L.; BIANCO, E.M.; ALMEIDA, M.T.R.; CARRARO, J.L.; CABRERA, G.M.; PALERMO, J.A.; SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. Polyoxygenated Steroids from the Octocoral *Leptogorgia punicea* and *in Vitro* Evaluation of their cytotoxic activity. **Marine Drugs**, v. 12, p. 5864-5880.

4- ALMEIDA, M.T.R.; TONINI, M.L.; GUIMARÃES, T.R.; BIANCO, E.M.; MORITZ, M.I.G.; OLIVEIRA, S.Q.; CABRERA, G.M.; PALERMO, REGINATTO, F.H.; STEINDEL, M.; SCHENKEL, E.P. Anti-infective Pregnane Steroid from the Octocoral *Carijoa riisei* Collected in South Brazil. Latin American **Journal of Pharmacy**, v. 31, p. 1489-1495, 2012.

5- GUIMARÃES, T.R.; QUIROZ, C.G.; RIGOTTO, C.; OLIVEIRA, S.Q.; ALMEIDA, M.T.R.; BIANCO, E.M.; MORITZ, M.I.G.; CARRARO, J.L.; PALERMO, J.A.; CABRERA, G.M.; SCHENKEL, E.P.; REGINATTO, F.H. **Marine Drugs**, v. 11, p. 4176-4192, 2013.